

Rationales Enzymdesign zur Optimierung dimodularer Peptidsynthetasen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Thomas Dürfahrt
aus Georgsmarienhütte

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 04. Dezember 2003 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars O. Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2003

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Duerfahrt, T., Doekel, S., Quaedflieg P.J.L.M & Marahiel, M.A. (2003) Construction of hybrid peptide synthetases for the production of α -L-aspartyl-L-phenylalanine, a precursor for the high-intensity sweetener aspartame. *Eur. J. Biochem*, **270**, 4555-4563.

Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Müller, R. & Marahiel, M.A. (2003) Rational design of a dimodular model system for the investigation of heterocyclization in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chem Biol*, im Druck.

Duerfahrt, T., Marahiel, M.A., Quaedflieg, P.J.L.M. & Sonke, T. (2003) Microbiological production method for α -L-aspartyl-L-phenylalanine. *Europäisches Patent eingereicht*, Pat.-Nr.: 03075583.9

Zusammenfassung

Die modular aufgebauten, multifunktionalen nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) katalysieren in vielen Mikroorganismen die Produktion strukturell vielfältiger, pharmakologisch interessanter Naturstoffe. Für die Integration eines Bausteins in das wachsende Produkt ist jeweils ein Modul verantwortlich, welches seinerseits in einzelne Domänen unterteilt werden kann. Diese Domänen katalysieren die Erkennung, Aktivierung und den Einbau der Substrate.

Aufgrund ihrer modularen Organisation stellen die NRPS ein geeignetes System für die gezielte Entwicklung artifizieller Enzyme dar. In dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien der Domänen- und Modulfusion verfolgt, um dimodulare Synthetasen für die Produktion des Dipeptids α -Aspartyl-Phenylalanin (Asp-Phe), das als Vorläufer in der Produktion des Zuckerersatzstoffs Aspartam eingesetzt wird, zu entwickeln. Ein Vergleich von sechs Asp-Phe-Synthetasen verdeutlicht die Auswirkungen von künstlichen Fusionen auf die Aktivität der Enzyme. So konnten deutliche Unterschiede in der Umsatzrate sowie die von der Umsatzrate abhängige Synthese des Nebenprodukts β -Asp-Phe beobachtet werden. Durch den Vergleich verschiedener Fusionsstrategien am Beispiel der Asp-Phe-Synthetasen konnte das Wissen über das Design hybrider Peptidsynthetasen erweitert werden.

Die strukturelle Vielfalt nichtribosomal synthetisierter Peptide wird nicht zuletzt durch die Katalyse von modifizierenden Domänen gewährleistet. Eine spezielle Domäne ist die Heterozyklisierungs-(Cy)-Domäne. Sie katalysiert neben der Bildung einer Peptidbindung die Zyklisierung der Seitenkette von Cystein, Serin oder Threonin zu Thiazolin- bzw. Oxazolin-Ringen. In dieser Arbeit wurde, basierend auf den ersten beiden Modulen der Bacitracin-Synthetase A, ein Modellsystem zur Untersuchung der Cy-Domäne entwickelt, welches das heterozyklische Isoleuciny-Thiazolinylcystein bildet. Ausgehend von diesem Modellsystem konnten durch Modulfusionen dimodulare Hybridsynthetasen konstruiert werden, deren Fähigkeiten, neue heterozyklische Produkte zu bilden, das biokombinatorische Potential der Cy-Domäne verdeutlichen.

Zusätzlich konnte durch Mutation von konservierten Resten innerhalb der Cy-Domäne des Modellsystems die Reaktionsabfolge von Peptidbindungsbildung und Zyklisierung aufgeklärt werden. Anhand der erhaltenen, mutierten Synthetasen, die nur noch die Bildung der Peptidbindung aber nicht die nachfolgende Zyklisierung katalysieren, konnte der Beweis für die Unabhängigkeit von Kondensations- und Heterozyklisierungsreaktion innerhalb der Cy-Domäne erbracht werden.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Abkürzungen | 5 |
| 2 | Einleitung | 8 |
| 2.1 | Antibiotika | 8 |
| 2.2 | Nichtribosomal synthetisierte Naturstoffe | 9 |
| 2.3 | Nichtribosomale Peptidsynthese | 11 |
| 2.3.1 | Modulaufbau und Domänenorganisation der nichtribosomalen Peptid-synthetasen | 12 |
| 2.3.1.1 | Die Adenylierungs-(A)-Domäne | 12 |
| 2.3.1.2 | Peptidyl-Carrier-Protein und Phosphopantetheintransferasen | 14 |
| 2.3.1.3 | Die Kondensations-(C)-Domäne | 15 |
| 2.3.1.5 | Gerichtete Peptidsynthese | 16 |
| 2.3.2 | Produktfreisetzung | 18 |
| 2.3.3 | Heterozyklisierung in NRPS | 20 |
| 2.3.3.1 | Modifikation von Heterozyklen | 23 |
| 2.3.4 | Optionale Domänen in der nichtribosomalen Peptidsynthese | 24 |
| 2.3.4.1 | Methylierung | 24 |
| 2.3.4.2 | Epimerisierung | 25 |
| 2.3.4.1 | Weitere Modifikationen | 26 |
| 2.3.5 | NRPS/PKS-Hybridsysteme | 27 |
| 2.4 | Das Peptidantibiotikum Bacitracin | 28 |
| 2.4.1 | Die Biosynthese des Bacitracins | 29 |
| 2.5 | Entwicklung und Design neuer NRPS | 30 |
| 2.5 | Aufgabenstellung | 33 |
| 3 | Material | 34 |
| 3.1 | Geräte | 34 |
| 3.2 | Chemikalien, Enzyme, Laborprodukte | 35 |
| 3.3 | Vektoren | 36 |
| 3.3.1 | pQE60 | 36 |
| 3.3.2 | pQE70 | 37 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.3 | pREP4 | 37 |
| 3.3.4 | pREP4[<i>gsp</i>] | 37 |
| 3.4 | Mikroorganismen | 37 |
| 3.4.1 | <i>E. coli</i> XL1-Blue | 37 |
| 3.4.2 | <i>E. coli</i> XL10 Gold | 38 |
| 3.4.3 | <i>E. coli</i> BL21(λ DE3) | 38 |
| 3.4.4 | <i>E. coli</i> M15 | 38 |
| 3.4.5 | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 | 38 |
| 3.4.6 | <i>Bacillus brevis</i> ATCC 8185 | 38 |
| 3.4.7 | <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 10716 | 38 |
| 3.5 | Medien | 39 |
| 4 | Methoden | 40 |
| 4.1 | Molekularbiologische Methoden | 40 |
| 4.1.1 | Konstruktion der Plasmide | 40 |
| 4.1.1.1 | Plasmide des Asp-Phe-Projekts | 40 |
| 4.1.1.2 | Cy-Projekt: Plasmide für die Hybridsynthetasen | 44 |
| 4.1.1.2 | Cy-Projekt: Plasmide für die Mutationsanalyse | 47 |
| 4.1.2 | DNA-Sequenzierung | 48 |
| 4.2 | Proteinchemische Methoden | 48 |
| 4.2.1 | Genexpression im pQE-Vektor-System | 48 |
| 4.2.2 | Zellaufschluss | 49 |
| 4.2.3 | Proteinreinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie | 49 |
| 4.2.4 | Reinigung der hybriden Asp-Phe-Synthetasen | 50 |
| 4.2.5 | Reinigung der Cy-Domänen-Synthetasen | 51 |
| 4.2.6 | Biochemische Charakterisierung – Aktivitätstests | 52 |
| 4.2.6.1 | ATP-PP _i -Austauschreaktion | 52 |
| 4.2.6.2 | Beladungsreaktion | 53 |
| 4.2.7 | Modifikation mit dem 4'-PP-Cofaktor <i>in vitro</i> | 53 |
| 4.3 | Produktanalytik | 54 |
| 4.3.1 | Dünnschichtchromatographie | 54 |
| 4.3.2 | HPLC-Analytik | 55 |
| 4.3.2.1 | HPLC/MS-Analyse – Asp-Phe-Konstrukte | 55 |

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.2.2 | HPLC/MS-Analyse – Cy-Konstrukte | 56 |
| 5 | Ergebnisse: Nichtribosomale Asp-Phe-Produktion | 57 |
| 5.1 | Nichtribosomale Asp-Phe-Synthetasen | 57 |
| 5.1.1 | Die rationale Entwicklung der Asp-Phe-Synthetasen | 59 |
| 5.1.2 | Konstruktion, Expression und Reinigung der Asp-Phe-Synthetasen | 62 |
| 5.1.3 | Biochemische Charakterisierung | 63 |
| 5.1.3.1 | ATP-PP _i -Austauschreaktion | 64 |
| 5.1.3.2 | Beladungsreaktion | 65 |
| 5.1.4 | Analyse der Produktbildung | 66 |
| 6 | Ergebnisse: Untersuchungen zur Heterozyklisierung in der nichtribosomalen Peptidsynthese | 71 |
| 6.1 | Entwicklung eines dimodularen Modellsystems | 71 |
| 6.1.1 | Konstruktion, Expression und Reinigung der BacA1-2-Te-Enzyme | 73 |
| 6.1.2 | Biochemische Charakterisierung | 74 |
| 6.1.2.1 | ATP-PP _i -Austauschreaktion | 74 |
| 6.1.2.2 | Beladungsreaktion | 75 |
| 6.1.3 | Produktbildung | 75 |
| 6.1.3.1 | Dünnschichtchromatographie | 75 |
| 6.1.3.2 | Produktanalyse mittels HPLC/MS | 77 |
| 6.2 | Die Cy-Domäne in Hybridenzymen | 78 |
| 6.2.1 | Heterozyklisierung in der Myxothiazol- und Mycobactinbiosynthese | 78 |
| 6.2.2 | Konstruktion hybrider dimodulare Peptidsynthetasen | 80 |
| 6.2.3 | Biochemische Charakterisierung | 82 |
| 6.2.3.1 | ATP-PP _i -Austauschreaktion | 82 |
| 6.2.3.2 | Beladungsreaktion | 83 |
| 6.2.4 | Produktbildung | 84 |
| 6.2.4.1 | Produktanalyse der Bac-Mbt-Hybridenzyme | 85 |
| 6.2.4.2 | Produktanalyse der Bac-Mta-Hybridenzyme | 86 |
| 6.3 | Mutationsanalyse der Cy-Domäne | 87 |
| 6.3.1 | Strategie der Mutationsanalyse und Herstellung der Mutanten | 88 |
| 6.3.2 | Biochemische Charakterisierung | 91 |
| 6.3.3 | Produktbildung | 91 |

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|------------|
| 7 | Diskussion | 94 |
| 7.1 | Asp-Phe-Synthese an hybriden NRPS | 94 |
| 7.1.1 | Konstruktion dimodularer Asp-Phe-Synthetasen durch Domänenfusionen | 95 |
| 7.1.2 | Aktivität der Asp-Phe-Synthetasen | 96 |
| 7.1.3 | Konkurrenz zwischen α -Asp-Phe und β -Asp-Phe | 96 |
| 7.1.4 | Mögliche Ursachen der β -Asp-Phe-Bildung | 97 |
| 7.1.4.1 | α -Asp- und β -Asp-Adenylierung | 98 |
| 7.1.4.2 | β -Asp-Phe-Produktion als Folge eines Umlagerungsprozesses | 99 |
| 7.1.5 | Auswirkungen verschiedener Fusionsstrategien | 101 |
| 7.1.6 | Nichtribosomale Asp-Phe-Synthetasen - Zusammenfassung | 104 |
| 7.2 | Untersuchung der Heterozyklisierung in NRPS | 105 |
| 7.2.1 | Das BacA1-2-Te-Modellsystem | 105 |
| 7.2.1.1 | Produktivität des Modellsystems BacA1-2-Te | 106 |
| 7.2.2 | Die Cy-Domäne in dimodularen Hybridsynthetasen | 107 |
| 7.2.2.1 | Enzymatische Aktivität der Bac-Mbt-Hybridsynthetasen | 109 |
| 7.2.2.2 | Enzymatische Aktivität der Bac-Mta-Hybridsynthetasen | 110 |
| 7.2.4 | Die Cy-Domäne-Hybride – Zusammenfassung und Ausblick | 111 |
| 7.2.5 | Mutationsanalyse der Cy-Domäne | 112 |
| 7.2.5.1 | Enzymatische Aktivität der Cy-Domäne-Mutanten | 114 |
| 7.2.6 | Der Reaktionsmechanismus der Cy-Domäne – Zusammenfassung und Ausblick | 116 |
| 8 | Anhang | 118 |
| 8.1 | Die konservierten <i>core</i> -Motive der NRPS-Domänen | 118 |
| 8.2 | Der nichtribosomale Code | 120 |
| 8.3 | Biosynthesesysteme | 123 |
| 8.4 | Oligonukleotide | 124 |
| 8.5 | Hybride Peptidsynthetasen | 126 |
| 9 | Literatur | 127 |

1 Abkürzungen

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| A-Domäne | Adenylierungs-Domäne |
| ACP-Domäne | <i>acyl-carrier</i> -Protein-Domäne |
| ACV | δ -(α -Aminoadipyl)-Cysteiny-D-Valin |
| Amp ⁿ | Ampicillin (n μ g/mL) |
| APM | α -L-Aspartyl-L-Phenylalaninmethylester |
| ArCP-Domäne | <i>aryl-carrier</i> -Protein-Domäne |
| AS | Aminosäure |
| ATCC | Stammsammlung (<i>American Type Culture Collection</i>) |
| Bac | Bacitracin |
| bp | Basenpaar |
| <i>bla</i> | Ampicillin-Resistenz-Kassette (codierendes Gen der β -Lactamase) |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>) |
| C-Domäne | Kondensations-Domäne (<i>condensation domain</i>) |
| CoA | Coenzym A (<i>coenzyme A</i>) |
| cpm | gezählte Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>) |
| Cy-Domäne | Heterozyklisierungs-Domäne (<i>cyclization domain</i>) |
| Da | Dalton |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DHB | 2,3-Dihydroxybenzoat |
| dNTP | 2'-Desoxynukleosidtriphosphat |
| dpm | Zerfälle pro Minute (<i>desintegrations per minute</i>) |
| DTE | 1,4-Dithioerythrol |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylendiamintetraacetat</i>) |
| ESI | Elektronen-Spray-Ionisierung |
| FPLC | schnelle Flüssigkeits-Chromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>) |
| FAS | Fettsäuresynthase |
| FMN | Flavin-Mononucleotid |
| Gsp | PPTase des Gramicidin S-Systems aus <i>Bacillus brevis</i> |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure |

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC | Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| IMAC | Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie |
| IPTG | Isoprenyl- β -D-thiogalaktosid |
| kb | Kilobasenpaare |
| Km ⁿ | Kanamycin (n μ g/mL) |
| L | Liter |
| LSC | Szintillationszähler (<i>liquid szintillation counter</i>) |
| m | <i>milli</i> (10^{-3}) |
| M | molar (mol/L) |
| Mbt | Mycobactin |
| M-Domäne | N-Methylierungs-Domäne |
| μ | <i>micro</i> (10^{-6}) |
| MCS | multipler Klonierungsbereich (<i>multiple cloning site</i>) |
| MS | Massenspektrometrie |
| Mta | Myxothiazol |
| n | <i>nano</i> (10^{-9}) |
| NRPS | nichtribosomale Peptidsynthetase |
| NTA | Nitrilotriacetat |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| <i>ori</i> | Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>) |
| p | <i>pico</i> (10^{-12}) |
| 4'-PP | 4'-Phosphopantethein |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCP-Domäne | <i>peptidyl-carrier</i> -Protein-Domäne |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PKS | Polyketidsynthase |
| PP _i | anorganisches Pyrophosphat (<i>inorganic pyrophosphate</i>) |
| PPTase | 4'-Phosphopantetheintransferase |
| RBS | ribosomale Bindungsstelle |
| SAM | S-Adenosylmethionin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>) |
| Sfp | PPTase des Surfactin-Systems aus <i>Bacillus subtilis</i> (<i>surfactin-production</i>) |

| | |
|-----------|------------------------------------------------|
| Srf | Surfactin |
| Te-Domäne | Thioesterase-Domäne |
| TFA | Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetate</i>) |
| Tyc | Tyrocidin |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolett |
| v/v | Volumen/Volumen |
| w/v | Gewicht/Volumen (<i>weight per volume</i>) |
| Yer | Yersiniabactin |

Tabelle 1.1: Aminosäuren

| Aminosäure | 3-Buchstaben-Code | 1-Buchstaben-Code | Molekulargewicht (g/mol) |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| Alanin | Ala | A | 89 |
| Arginin | Arg | R | 174 |
| Asparagin | Asn | N | 132 |
| Aspartat | Asp | D | 133 |
| Cystein | Cys | C | 121 |
| Glutamat | Glu | E | 147 |
| Glutamin | Gln | Q | 146 |
| Glycin | Gly | G | 75 |
| Histidin | His | H | 155 |
| Isoleucin | Ile | I | 131 |
| Leucin | Leu | L | 131 |
| Lysin | Lys | K | 146 |
| Methionin | Met | M | 149 |
| Ornithin | Orn | O | 132 |
| Phenylalanin | Phe | F | 165 |
| Prolin | Pro | P | 115 |
| Serin | Ser | S | 105 |
| Threonin | Thr | T | 119 |
| Tryptophan | Trp | W | 204 |
| Tyrosin | Tyr | Y | 181 |
| Valin | Val | V | 117 |

2 Einleitung

2.1 Antibiotika

Antibiotika sind in der modernen Medizin seit der Entdeckung des Penicillins [Flemming, 1929] die wahrscheinlich wichtigsten Hilfsmittel zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Sie stoppen das Wachstum der Krankheitserreger oder töten diese sogar ab. Neben der Herstellung durch chemische Synthese werden Antibiotika größtenteils aus Mikroorganismen gewonnen. Diese natürlichen Produkte entstammen meist dem Sekundärmetabolismus von Bakterien und Pilzen, wobei der Hauptteil der medizinisch interessanten Naturstoffe von Bakterien der Spezies *Actinomyces* produziert wird. Die Naturstoff-Produzenten sind in der Lage, Verbindungen mit einer enormen strukturellen und funktionellen Vielfalt zu produzieren, die ein wichtiges Potential für die Entwicklung neuer Medikamente darstellt. Bedeutende Vertreter der eingesetzten Naturstoffe sind z.B. die Penicilline, Cephalosporine, Cyclosporine, das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin sowie das Makrolidantibiotikum Erythromycin.

Ein gravierendes Problem in der Medizin ist trotz der Vielzahl bekannter Wirkstoffe die Ausbildung von Resistenzen. Diese können sich, bedingt durch die schnelle Anpassung der Erreger an ein eingesetztes Antibiotikum, innerhalb weniger Tage entwickeln. Durch Mutationen in der chromosomalen DNA oder in Folge der Aufnahme Resistenz vermittelnder DNA, z.B. durch Transformation oder Transduktion, entwickeln Mikroorganismen verschiedenste Mechanismen, um sich der Wirksamkeit eines Medikaments zu entziehen [Walsh, 2000]. Zu diesen Mechanismen gehören die Modifikation der eingesetzten Antibiotika, wie die Hydrolyse durch β -Lactamasen [Bush & Mobashery, 1998], die Induktion von Effluxpumpen, die eine Ausschleusung der Antibiotika hervorrufen [Paulsen et al., 1996] oder Modifikationen des Zielmoleküls des Antibiotikums, wie es im Fall der Vancomycin-Resistenz beobachtet wird [Hubbard & Walsh, 2003]. Das Auftreten immer neuer resistenter Organismen führte zu einem regelrechten Wettlauf zwischen Krankheitserregern und der Entwicklung verbesserter Antibiotika. Neben der semisynthetischen Veränderung bzw. Verbesserung der Naturstoffe [Schreiber, 1998] spielt die Aufklärung und die gezielte Manipulation der natürlichen Biosynthesewege in den Produzentenstämmen eine

wichtige Rolle für die Weiterentwicklung des Wirkstoffdesigns [Marahiel et al., 1997; von Döhren et al., 1997; Walsh, 2002].

Die Mikroorganismen nutzen verschiedene komplexe Systeme für die Produktion der Naturstoffe. Die Biosynthese vieler biorelevanter Verbindungen wird durch große multimodulare Enzyme und Enzymkomplexe, den Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), katalysiert [Schwarzer & Marahiel, 2001]. Diese Synthesemaschinerien des Sekundärmetabolismus stellen ein großes Potential der Naturstoffproduktion aber auch ihrer gezielten Veränderung dar.

2.2 Nichtribosomal synthetisierte Naturstoffe

Eine pharmakologisch besonders interessante Naturstoffgruppe bilden die nichtribosomal synthetisierten Peptide. Filamentöse Pilze und Bakterien produzieren zahlreiche kurze Oligopeptide auf diese, zur ribosomalen Synthese von Peptiden alternative Weise. Aufgrund spezieller Eigenschaften der multifunktionalen NRPS kann eine hohe strukturelle Vielfalt erreicht werden, die in der ribosomalen Synthese nicht möglich wäre. So können auch nichtproteinogene Aminosäuren sowie Carboxy- oder Hydroxysäuren in das Peptid eingefügt werden. Der Einbau von D-Aminosäuren oder die Modifikation durch N-, C-, oder O-Methylierung, Glykosylierung und Heterozyklisierung sind weitere übliche Strategien zur Produktion strukturell vielseitiger Verbindungen [Schwarzer et al., 2003; Walsh et al., 2001]. Einige Beispiel nichtribosomal synthetisierter Peptide sind in Abb. 2.1 gezeigt.

Die bekanntesten Antibiotika, die Penicilline, werden wie auch die Cephalosporine aus dem nichtribosomal synthetisierten ACV-Tripeptid (**1**) gebildet [Diez et al., 1990; Smith et al., 1990]. Andere Beispiele für nichtribosomal synthetisierte Peptidantibiotika sind Bacitracin (**2**) [Eppelmann et al., 2001; Konz et al., 1997] und Tyrocidin (**3**) [Mootz & Marahiel, 1997] sowie das als Reserveantibiotikum bekannte Vancomycin (**4**) [Hubbard & Walsh, 2003; van Wageningen et al., 1998].

Aufgrund ihrer Vielfalt besitzen nichtribosomal produzierte Naturstoffe ein breites Wirkungsspektrum und können neben ihrer Wirkung als Antibiotika auch in anderen Bereichen der modernen Medizin eingesetzt werden. So finden sie Anwendung als Antitumor-Wirkstoffe oder Immunsuppressiva.

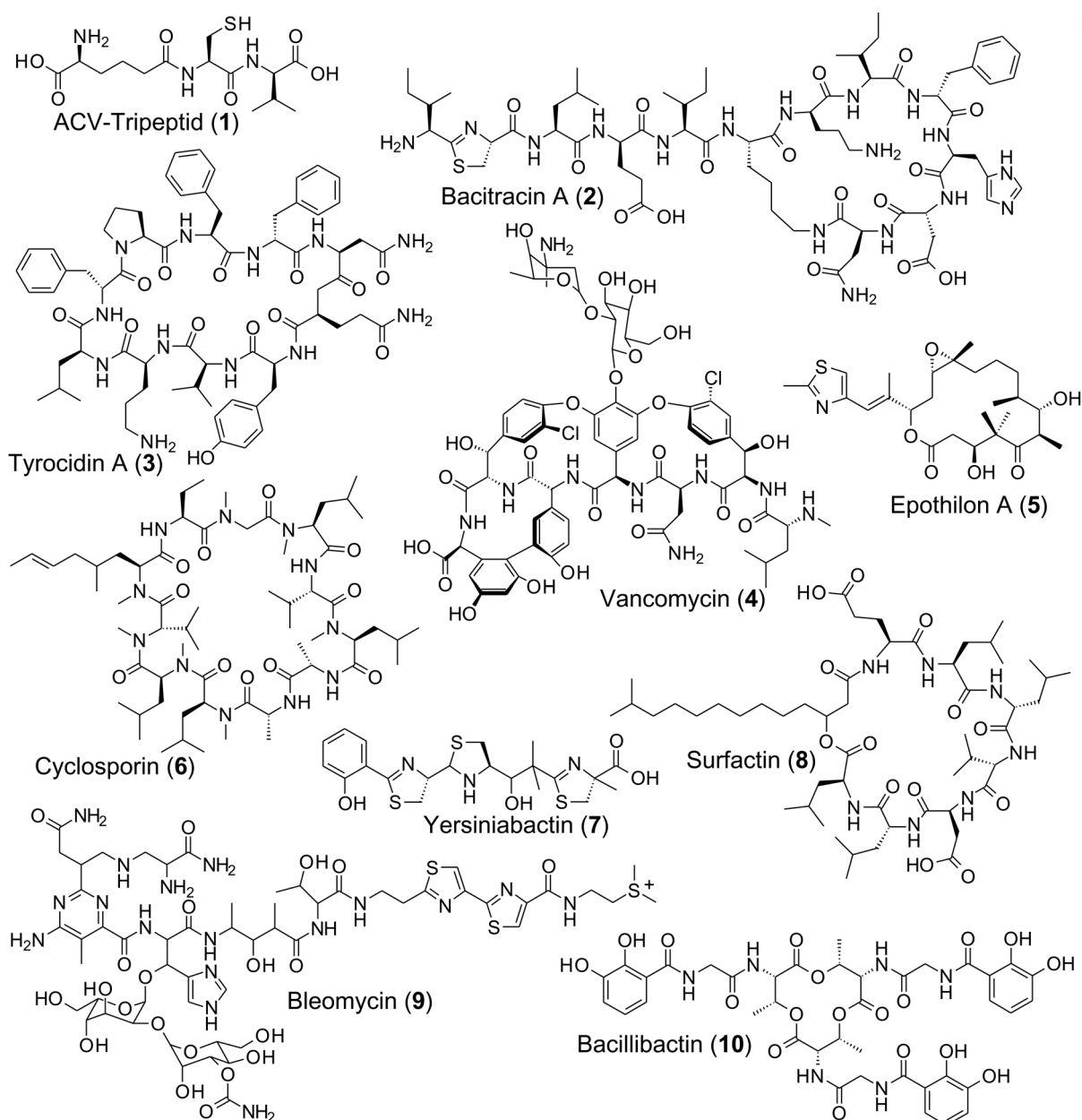


Abb. 2.1: Nichtribosomal synthetisierter Naturstoffe. Gezeigt sind ACV (1) aus *Penicillium chrysogenum*, Bacitracin A (2) (*Bacillus licheniformis*), Tyrocidin A (3) (*Bacillus brevis*), Vancomycin (4) (*Amycolatopsis orientalis*), Epothilon A (5) (*Sorangium cellulosum*), Cyclosporin (6) (*Tolypocladium niveum*), Yersiniabactin (7) (*Yersinia pestis*), Surfactin (8) (*Bacillus subtilis*), Bleomycin (9) (*Streptomyces verticulus*) und Bacillibactin (10) (*Bacillus subtilis*).

Als Immunsuppressivum wird u.a. das Cyclosporin (6) [Weber et al., 1994] in der Behandlung nach Transplantationen eingesetzt. In der Krebstherapie kommen nichtribosomal synthetisierte Naturstoffe, wie zum Beispiel Bleomycin (9) [Du et al., 2000; Shen et al., 2002] und Epothilon (5) [Molnar et al., 2000; Tang et al., 2000] zum Einsatz.

Neben diesen pharmakologisch interessanten Verbindungen, deren natürliche Funktionen in den Produzentenstämmen zum großen Teil unbekannt sind, werden auch Sekundärmetabolite produziert, die nicht von pharmakologischem Interesse sind, aber das Überleben der Produzenten unter bestimmten Bedingungen

sicherstellen. Zu diesen, ebenfalls nichtribosomal synthetisierten Produkten, gehören zum Beispiel die Siderophore Bacillibactin (**10**) [May et al., 2001] und Yersiniabactin (**7**) [Gehring et al., 1998b; Miller et al., 2002]. Diese werden unter Eisenmangelbedingungen produziert, um Eisenionen in der Umgebung zu komplexieren, in die Zellen zu transportieren und dort wieder freizugeben. Die Siderophor-Biosynthesesysteme pathogener Organismen bieten ein interessantes Ziel für deren Bekämpfung, da die Siderophore zum Überleben im infizierten Körper notwendig sind. So kann das Verständnis der nichtribosomalen Peptidsynthese nicht nur zum Design neuer Enzyme, sondern auch für die Identifizierung von Angriffspunkten zur Bekämpfung von Krankheitserregern dienen.

2.3 Nichtribosomale Peptidsynthese

Die NRPS katalysieren die Bildung des Grundgerüsts der Peptide. Häufig sind ihre Gene mit denen modifizierender Enzyme in Operons organisiert. Die Biosynthese des Peptidrückgrats erfolgt meist im Zusammenspiel mehrerer NRPS. In einzelnen Fällen, überwiegend in pilzlichen Systemen, erfolgt sie aber auch an nur einer, multimodularen Synthetase. Ein solches außergewöhnliches System stellt die 1,6 MDa große Cyclosporin-Synthetase dar, die als einzelnes Enzym die Bildung der Peptidkette des Immunsuppressivums Cyclosporin A (**6**) unter Verwendung von insgesamt 11 Modulen katalysiert [Weber et al., 1994].

Die NRPS dienen als enzymatische Vorlage für die Peptidsynthese, wobei die einzelnen Module funktionelle Einheiten bilden, die für den Einbau jeweils eines Substrates in die wachsende Peptidkette verantwortlich sind. So ist in den meisten Fällen die Sequenz und Beschaffenheit der Produkte durch die Anzahl und Anordnung der Module bestimmt. Es werden aber auch immer mehr NRPS gefunden, die nicht diesem Kollinearitäts-Prinzip gehorchen [Mootz et al., 2002b]. Bei den iterativen NRPS können, wie im Fall der Bacillibactin-Synthetase [May et al., 2001], ein oder mehrere Module mehrfach genutzt werden. Eine große Gruppe bilden die nicht-linearen NRPS, die in ihrem Modulaufbau vom Standard der linearen NRPS abweichen. Zu dieser gehören zum Beispiel die Synthetasen des Bleomycins (**9**) und des Yersiniabactins (**7**).

2.3.1 Modulaufbau und Domänenorganisation der nichtribosomalen Peptid-synthetasen

Die Komplexität der nichtribosomal synthetisierten Peptide steht im Gegensatz zum einfachen Aufbau der Synthetasen. Der Ablauf der einzelnen Reaktionen wird durch das *multiple-carrier-thiotemplate*-Modell beschrieben [Stein et al., 1996], wobei innerhalb eines Moduls die Domänen die eigentlichen funktionellen Einheiten bilden. Dabei kann zwischen essentiellen und optionalen bzw. modifizierenden Domänen unterschieden werden. Für die Erkennung, Aktivierung und den Einbau einer Substrataminosäure sind innerhalb eines Moduls die essentiellen Domänen verantwortlich, durch deren Katalyse das Grundgerüst des Peptids gebildet wird. Die Aktivierung der Substrataminosäure erfolgt durch die Adenylierungs-(A)-Domäne, die das aktivierte Substrat auf ein benachbartes *peptidyl-carrier*-Protein (PCP) überträgt. Die Knüpfung der Peptidbindung erfolgt durch die Katalyse einer Kondensations-(C)-Domäne. Diese drei Domänen, C, A und PCP, werden auch als *core*-Domänen bezeichnet. Sie bilden ein sogenanntes minimales Elongationsmodul, da sie für die Kettenverlängerung um eine Aminosäure, die Elongation, verantwortlich sind. Innerhalb einer Gruppe zeigen die Domänen unterschiedlich hohe Homologie, allerdings besitzen alle NRPS-Domänen hochkonservierte Bereiche, sogenannte *core*-Motive, die auch der Identifizierung des Domärentyps dienen können [Gocht & Marahiel, 1994; Konz & Marahiel, 1999] (vgl. Kapitel 8.1).

2.3.1.1 Die Adenylierungs-(A)-Domäne

Die bedeutendste Rolle innerhalb eines Moduls übernimmt die ca. 550 Aminosäuren umfassende Adenylierungs-(A)-Domäne. Sie ist verantwortlich für die Erkennung und Aktivierung des Substrates. Die Zusammensetzung des synthetisierten Peptids wird maßgeblich durch ihre Selektivität bestimmt. Die A-Domänen gehören, wie auch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und die Luciferase aus *Photinus pyralis*, zur Gruppe der adenylatbildenden Enzyme und katalysieren die ATP-abhängige Aktivierung der Aminosäuren als Aminoacyl-Adenylat [Dieckmann et al., 1995; Pavela-Vrancic et al., 1999] (siehe Abb. 2.2). Zur Luciferase zeigen die A-Domänen hohe strukturelle Homologie [Conti et al., 1996; Conti et al., 1997]. Obwohl die Art der Aminosäureaktivierung eine Gemeinsamkeit zur ribosomalen Peptidsynthese darstellt, besteht zwischen den A-Domänen und den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen keine sequenzielle oder strukturelle Ähnlichkeit [Eriani et al., 1990; Rapaport et al., 1987].

Untereinander zeigen die A-Domänen Homologien von bis zu 60%. Dabei spielen die hochkonservierten *core*-Bereiche eine besondere Rolle. Durch Sequenzvergleiche konnten insgesamt 10 *core*-Motive identifiziert werden, die in allen bekannten A-Domänen zu finden sind [Marahiel et al., 1997] (vgl. Kapitel 8.1). In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass Reste dieser Bereiche wichtige Funktionen in der Katalyse übernehmen [Gocht & Marahiel, 1994]. Durch Kristallstrukturanalysen der A-Domänen PheA der Gramicidin S-Synthetase A (GrsA) sowie der Dihydroxybenzoat aktivierenden A-Domäne DhbE des Bacillibactin-Biosynthesesystems, wurde nachgewiesen, dass viele Aminosäuren der *core*-Motive an der Koordination des ATP beteiligt sind [Conti et al., 1997; May et al., 2002]. Die Erkennung und Bindung des Substrates erfolgt in einer Bindungstasche, die im Wesentlichen von zehn Resten im Bereich zwischen den *core*-Motiven A4 und A5 gebildet wird. Diese zehn Aminosäuren können als „nichtribosomaler Code“ (NRPS-Code) bezeichnet werden, da ihre Zusammenstellung die Selektivität der A-Domäne bestimmt [Stachelhaus et al., 1999]. Der Aminosäurerest Lys517 (Position bezogen auf PheA [Stachelhaus et al., 1999]) ist in allen, das Asp235 mit wenigen Ausnahmen in allen A-Domänen konserviert. Diese beiden Reste sind verantwortlich für die Koordinierung der α -Amino- und α -Carboxyl-Gruppe der Substrataminosäure. Die übrigen Positionen der Bindungstasche variieren je nach Substrat entsprechend (vgl. Kapitel 2.5).

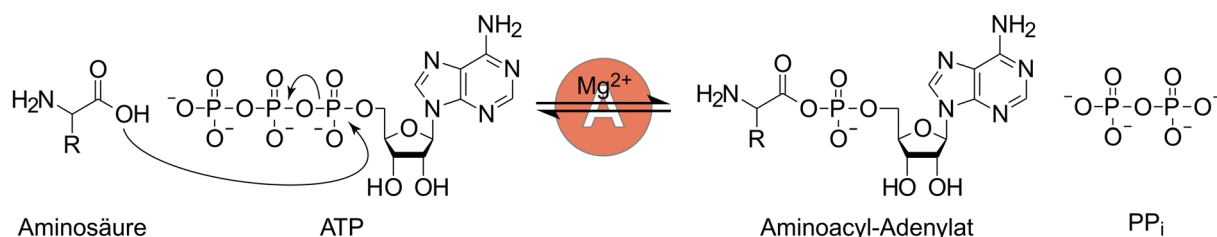


Abb. 2.2: Substraterkennung und -aktivierung. Die A-Domäne erkennt spezifisch die Substrataminosäure und aktiviert diese in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} unter Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat als Aminoacyl-Adenylat.

Aufgrund des NRPS-Codes lassen sich Vorhersagen über die wahrscheinliche Substrataminosäure unbekannter A-Domänen treffen. Außerdem bietet die gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität von A-Domänen durch gerichtete Mutagenese eine wichtige Möglichkeit in der Entwicklung neuer NRPS [Eppelmann et al., 2002].

Eine Besonderheit bilden freistehenden A-Domänen, die nicht in Modulen organisiert sind. Häufig aktivieren diese speziellen Domänen aromatische Carboxy-

säuren, wie z.B. das von der Synthetase DhbE aktivierte Dihydroxybenzoat bei der Synthese des Siderophors Bacillibactin. Durch die Kristallstruktur des DhbE konnte der NRPS-Code für solche Carboxysäuren aktivierenden A-Domänen bestätigt und erweitert werden [May et al., 2002].

2.3.1.2 Peptidyl-Carrier-Protein und Phosphopantetheintransferasen

Carrier-Proteine sind zentrale Proteine in verschiedenen multifunktionalen Enzymen und Enzymkomplexen, die allerdings keine eigene katalytische Funktion übernehmen. Wie aus der Fettsäuresynthese und der Polyketidsynthese bekannt, haben auch in der nichtribosomalen Peptidsynthese *carrier*-Proteine mit einer Größe von ca. 80 Aminosäuren die Aufgabe, die aktivierten Substrate bzw. Syntheseintermediate für die katalytischen Zentren der angrenzenden Enzyme zugänglich zu machen [Cane & Walsh, 1999; Crump et al., 1997]. Aufgrund der auf ihren 4'-Phosphopantethein-(4'-PP)-Cofaktor übertragenen Substrate, werden sie in den NRPS analog zu den *acyl-carrier*-Proteinen (ACP) aus der Fettsäuresynthese als *peptidyl-carrier*-Proteine (PCP) bezeichnet [Rawlings & Cronan, 1992; Stachelhaus et al., 1996] (siehe Abb. 2.3). Die von der A-Domäne aktivierten Aminosäuren werden dabei unter Abspaltung von AMP als Thioester kovalent an den Cofaktor gebunden und können so zu den aktiven Zentren der benachbarten Domänen transportiert werden.

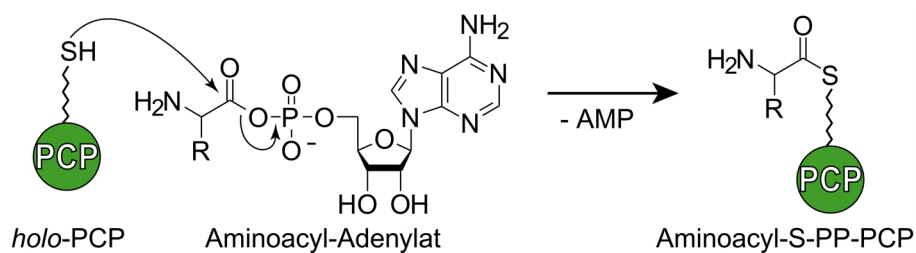


Abb. 2.3: Beladung der PCP-Domäne. Die aktivierte Aminosäure wird unter Abspaltung von AMP kovalent als Thioester auf dem 4'-PP-Cofaktor der PCP-Domäne gebunden.

Durch die Reaktionsabfolge bedingt, benötigt jedes Modul innerhalb einer Synthetase eine PCP-Domäne. Allerdings sind, wie bei den A-Domänen, auch distinkte *carrier*-Proteine bekannt, die meist in Siderophor-Systemen auftreten und dort die aktivierten Carboxysäuren übernehmen [Crosa & Walsh, 2002]. Daher werden diese speziellen *carrier*-Proteine auch als *aryl-carrier*-Proteine (ArCP) bezeichnet.

Die Transformation des PCs von der inaktiven *apo*- in die aktive *holo*-Form resultiert aus einer posttranslationalen Modifikation. Katalysiert durch 4'-Phospho-

pantethein-Transferasen (PPTasen) erfolgt ein nucleophiler Angriff der Hydroxylgruppe des hochkonservierten Serins des PCPs auf die β -Phosphatgruppe des CoA [Lambalot et al., 1996; Quadri et al., 1998b] (siehe Abb. 2.4). Für die auch als *priming* bezeichnete Modifikation der unterschiedlichen *carrier*-Proteine wurden verschiedene PPTasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten identifiziert [Finking et al., 2002; Mofid et al., 2002]. So erkennt die PPTase AcpS aus *E. coli* selektiv nur die *carrier*-Proteine des Primärmetabolismus. Andere PPTasen, wie das Sfp aus *B. subtilis*, besitzen eine breite Substratspezifität für die *carrier*-Proteine des primären und des sekundären Stoffwechsels. Sowohl von einer PCP-Domäne (TycB3-PCP) als auch von den PPTasen Sfp und ACPS sind die Strukturen gelöst worden [Parris et al., 2000; Reuter et al., 1999; Weber et al., 2000]. PCP-Domänen bilden eine verdrehte antiparallele Vier-Helix-Struktur. Es konnte gezeigt werden, dass die zweite Helix für die Erkennung und die Protein-Protein-Interaktion mit der PPTase verantwortlich ist [Mofid et al., 2002].

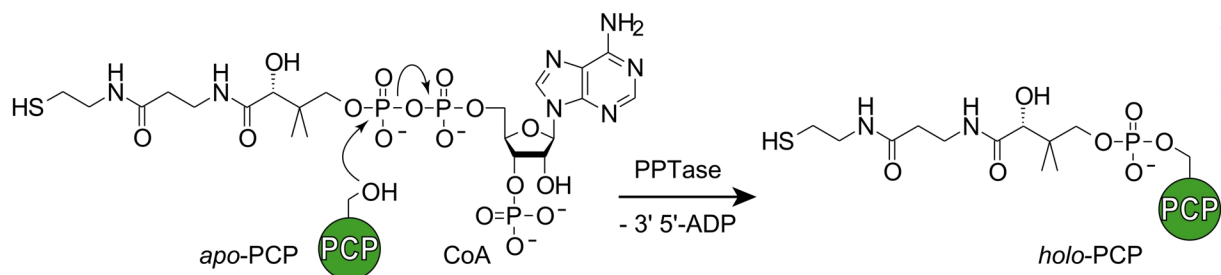


Abb. 2.4: Posttranslationale Modifikation der PCP-Domäne. PPTasen katalysieren die Modifikation der PCP-Domänen in die aktive *holo*-Form. Dabei wird die 4'-Phosphopantethein-Einheit von CoA auf einen invarianten Serin-Rest des PCPs übertragen.

2.3.1.3 Die Kondensations-(C)-Domäne

Die Bildung der Peptidbindung wird durch die ca. 450 Aminosäuren umfassende Kondensations-(C)-Domäne katalysiert [Bergendahl et al., 2002; Stachelhaus et al., 1998]. Durch einen nucleophilen Angriff der α -Aminogruppe der PCP-gebundenen Aminosäure auf das Thioester-Carbonyl-C-Atom des stromaufwärts gebundenen Aminoacyl- oder Peptidyl-Restes wird die Peptidkette unter Spaltung des Thioesters verlängert (siehe Abb. 2.5). Untersuchungen der C-Domäne haben gezeigt, dass sie neben der A-Domäne eine weitere Möglichkeit der Spezifikation innerhalb der NRPS aufweisen [Belshaw et al., 1999; Ehmann et al., 2000]. Danach besitzt die C-Domäne zwei aktive Seiten: An der Donor-Position werden die Aminoacyl- oder Peptidyl-Einheiten des vorangehenden Moduls koordiniert. Auf der Akzeptor-Seite

wird die Aminosäure des eigenen Moduls erkannt, auf die dann die Übertragung zur Kettenverlängerung stattfindet (siehe auch nachfolgendes Kapitel: „Gerichtete Peptidsynthese“). Die Akzeptor-Position besitzt eine intrinsische Spezifität für das PCP-gebundene Aminoacyl-Nucleophil des eigenen Moduls. Zwar ist diese Spezifität nicht so stark ausgeprägt, wie bei der A-Domäne, kann aber trotzdem als wichtiger Schritt in der Kontrolle der Synthese angesehen werden. Die C-Domäne differenziert dabei nicht nur zwischen den Enantiomeren, sondern erkennt auch Veränderungen in der Seitenkette.

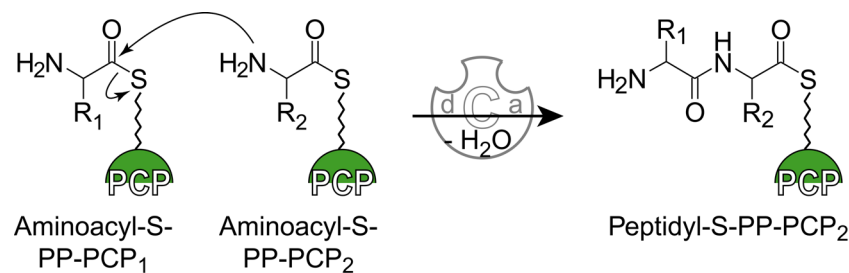


Abb. 2.5: Die Kondensationsreaktion. Die Bildung der Peptidbindung wird durch die C-Domäne katalysiert. Durch einen nucleophilen Angriff der in der Akzeptor-Position (a) koordinierten Aminosäure auf den in der Donor-Position (d) koordinierten Aminoacyl- oder Peptidyl-Rest kommt es zur Kettenverlängerung.

Die kürzlich aufgeklärte Struktur der distinkten C-Domäne VibH aus dem Vibriobactin-Biosynthesesystem erweitert das Verständnis dieser Domäne [Keating et al., 2002]. Danach besteht die pseudodimere C-Domäne aus zwei Untereinheiten, die jeweils eine $\alpha\beta\alpha$ -sandwich-Struktur ausbilden. Im Interface zwischen diesen Untereinheiten bildet sich ein Solventkanal, in dem das HHxxxDG-(C3)-core-Motif, dessen Funktion in der Katalyse der Kondensationsreaktion nachgewiesen wurde [Bergendahl et al., 2002; Marshall et al., 2002], lokalisiert ist. Durch diesen Solventkanal werden das sogenannte C-face und das N-face miteinander verbunden, die jeweils für die Koordination des Nucleophils und des Elektrophils verantwortlich sind. Diese Strukturdaten bekräftigen die Theorie der räumlich getrennten putativen Donor- und Akzeptor-Positionen der C-Domäne.

2.3.1.5 Gerichtete Peptidsynthese

Die essentiellen Domänen, C, A und PCP, bilden das Grundgerüst der NRPS. Ein minimales Elongationsmodul, für den Einbau einer Substrataminosäure in das entstehende Peptid, besteht demnach aus einer Peptidbindung bildenden C-Domäne, der Substrat erkennenden und aktivierenden A-Domäne und dem PCP,

welches die Translokation der Substrate ermöglicht. Aufgrund der beschriebenen Spezifität der Akzeptor-Position der C-Domäne wurde die Organisation eines Elongationsmoduls als C-A-PCP-Einheit definiert [Mootz et al., 2002b].

Die Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese erfolgt häufig durch Initiationsmodule mit der Domänenorganisation A-PCP. Durch die Aktivierung des ersten Substrates wird die Biosynthese gestartet [Keating & Walsh, 1999]. Die erste 4'-PP-gebundene Aminosäure (Aminoacyl-S-PP) bildet den ersten Donor, bzw. das erste Elektrophil für die Bildung der peptidischen Bindung. Es folgen die weiteren Syntheseschritte an den beschriebenen Elongationsmodulen nach dem *multiple-carrier-thiotemplate*-Modell [Stein et al., 1996] (siehe Abb. 2.6).

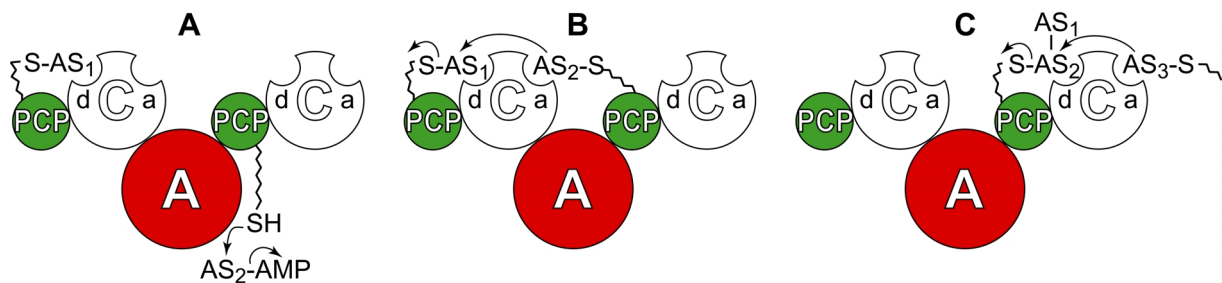


Abb. 2.6: Reaktionsabfolge des Elongationsmoduls. (A) Die A-Domäne aktiviert das Substrat als Aminoacyl-Adenylat und überträgt die Aminosäure auf den 4'-PP-Arm der PCP-Domäne. (B) Die 4'-PP-PCP-gebundene Aminosäure (AS₂-S) wird an der Akzeptor-Position (a) der C-Domäne koordiniert. Durch die C-Domäne katalysiert findet die Bildung der Peptidbindung statt. (C) Nach Translokation des entstandenen Peptidyl-S-PP (AS₁-AS₂-S) zur Donor-Position (d) der stromabwärts benachbarten C-Domäne erfolgt am nächsten Modul ein weiterer Elongationsschritt.

Dem PCP kommt, wie erwähnt, eine zentrale Rolle zu, da der 4'-PP-Cofaktor die Substrate als flexible prosthetische Gruppe zu den verschiedenen katalytischen Zentren transportiert. Während der Elongation wird die kognate Aminosäure durch die A-Domäne aktiviert und als Thioester am 4'-PP-Arm des PCPs gebunden. Die C-Domäne koordiniert dieses Aminoacyl-S-PP an ihrer Akzeptor-Position bis die Kondensation mit dem stromaufwärts gebundenen Aminoacyl-S-PP oder Peptidyl-S-PP vollzogen worden ist. Die C-Domäne besitzt wahrscheinlich eine geringere Affinität zum neu gebildeten Peptidyl-PP, so dass es aus der Akzeptor-Position entlassen und vom 4'-PP-Cofaktor zur Donor-Position der nächsten C-Domäne transportiert wird, wo es als Elektrophil eines weiteren Elongationsschrittes eingesetzt werden kann. Die gerichtete Peptidsynthese wird dabei auch durch die C-Domäne sichergestellt. Die Abfolge der Substratkoordination an Akzeptor- und Donor-Position verhindert eine falsche Initiation der Peptidsynthese [Linne & Marahiel, 2000].

2.3.2 Produktfreisetzung

Der letzte Schritt in der nichtribosomalen Peptidsynthese ist die Abspaltung des Peptids vom Enzym-Templat, wobei in verschiedenen Systemen unterschiedliche Strategien zur Freisetzung des Produktpeptids verwendet werden. In den meisten bakteriellen Systemen wird diese Termination der Peptidbiosynthese durch Domänen katalysiert, die aufgrund der katalysierten Reaktion der Familie der Thioesterasen zugeordnet werden [Schneider & Marahiel, 1998; Trauger et al., 2000] (siehe Abb. 2.7).

Diese etwa 250 Aminosäuren umfassenden Thioesterase-(Te)-Domänen schließen sich C-terminal an das PCP des letzten Moduls an. Sie spalten den Thioester zwischen 4'-PP-Cofaktor und dem linearen Produkt und binden dieses an einem invarianten Serin-Rest [Kohli et al., 2001; Trauger et al., 2000]. Häufig erfolgt die Produktfreisetzung unter Makrozyklisierung, die aus der Bildung einer Peptidbindung resultiert (z.B. in der Biosynthese des Tyrocidins (**3**) [Mootz & Marahiel, 1997]) oder Folge einer Laktonisierung ist, wie im Fall des Surfactins (**8**) [Cosmina et al., 1993]. Auch verzweigt-zyklische Produkte, die durch die Kondensation einer Seitenkette mit der C-terminalen Carboxyl-Gruppe entstehen, sind bekannt (z.B. Bacitracin (**2**) [Konz et al., 1997]).

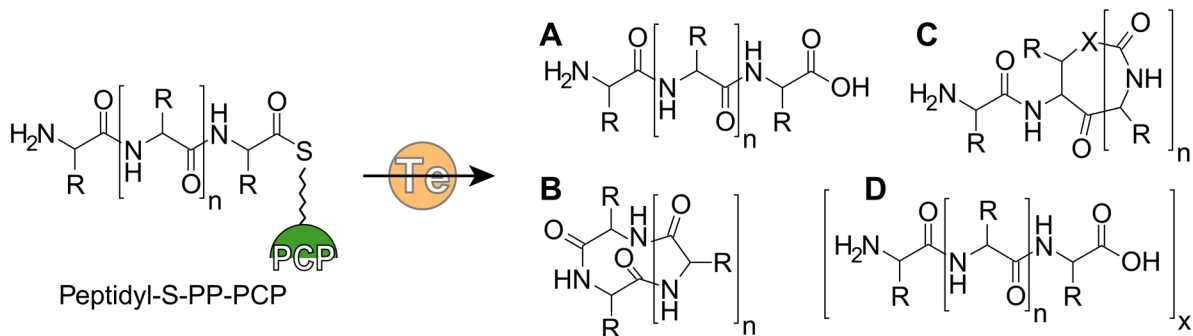


Abb. 2.7: Produktabspaltung durch die Te-Domäne. Die Te-Domänen katalysieren die Termination der Peptidsynthese unter Abspaltung linearer (A), zyklischer (B), verzweigt-zyklischer (C) (X=N,O) oder multimerer (D) Produkte.

In der Biosynthese der Siderophore katalysieren Te-Domänen zum Teil auch Multimerisierungen. So werden Enterobactin und Bacillibactin (**10**) durch Trilactonisierung gebildet [May et al., 2001; Shaw-Reid et al., 1999]. Neben der Zyklisierung kann die Termination aber auch unter Hydrolyse erfolgen, wodurch lineare Produkte wie das Yersiniabactin (**7**) [Miller et al., 2002] oder das ACV-Tripeptid (**1**) freigesetzt werden.

Die Kristallstruktur-Analyse der Te-Domäne der Surfactin Synthetase C (SrfC) sowie mechanistische Untersuchungen erlaubten detaillierte Einblicke in die Katalyse dieser Domänen [Bruner et al., 2002]. Nach der Translokation der Peptidkette auf das Serin des aktiven Zentrums der zur Familie der α/β -Hydrolasen gehörenden Te-Domäne findet die Hydrolyse oder der intramolekulare nucleophile Angriff statt. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion der Te-Domänen durch eine katalytische Triade, bestehend aus Asp-, His- und Ser-Resten, katalysiert wird [Pazirandeh et al., 1991; Schneider & Marahiel, 1998; Shaw-Reid et al., 1999].

Die durch eine Te-Domäne katalysierte Abspaltung ist die häufigste Art der Produktfreisetzung. Daneben gibt es alternative Möglichkeiten der Termination der nichtribosomalen Peptidsynthese (siehe Abb. 2.8). In einigen pilzlichen Systemen, wie im Fall des Cyclosporin, werden C-terminale C-Domänen gefunden, die die Makrozyklisierung unter Bildung einer Peptidbindung katalysieren. Bislang ist aber wenig über diese speziellen C-Domänen bekannt [Weber et al., 1994]. Eine weitere Möglichkeit bildet die Freisetzung linearer Peptide unter Katalyse einer Reduktase-(R)-Domäne, wie sie aus der Lysin-Biosynthese in Hefe bekannt ist [Casqueiro et al., 1998; Ehmann et al., 1999]. Die

NADPH-abhängigen R-Domänen katalysieren die Produktabspaltung durch Reduktion der C-terminalen α -Carboxyl-Gruppe zum entsprechenden Aldehyd, wie beispielsweise in der Biosynthese des linearen Gramacidins in *B. brevis* [Kessler & Marahiel, 2003], oder zum Alkohol, wie in der Myxochelin-Synthese in *S.*

aurantiaca [Gaitatzis et al., 2001; Silakowski et al., 2000].

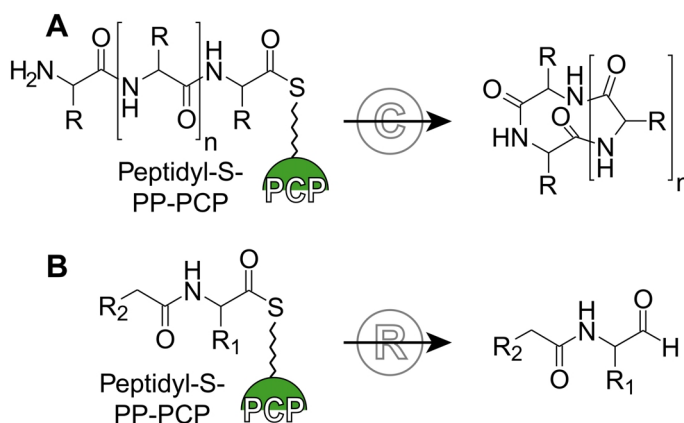


Abb. 2.8: Alternative Produktabspaltung. (A) Spezielle C-Domänen katalysieren die Produktfreisetzung unter Bildung eines Makrozyklus. (B) R-Domänen katalysieren die Produktfreisetzung unter Bildung linearer Aldehyde.

2.3.3 Heterozyklisierung in NRPS

Die strukturelle Vielfalt der nichtribosomal synthetisierten Peptide beruht nicht nur auf der Aktivierung und dem Einbau ungewöhnlicher Substrate und den Möglichkeiten der linearen oder zyklischen Freisetzung, sondern sie ist nicht zuletzt ein Resultat verschiedener weiterer Modifikationen.

Eine besondere Veränderung des Peptidrückgrats ist die Bildung fünfgliedriger, heterozyklischer Ringe. Diese drastische chemische Modifikation, die während der Kettenverlängerung eintritt, beruht auf der Zyklisierung von Cystein-, Serin- oder Threonin-Seitenketten, die in der Bildung der entsprechenden dihydroheteroaromatischen Oxazoline bzw. Thiazoline resultiert. Katalysiert wird die Ringbildung durch spezielle Heterozyklisierungs-(Cy)-Domänen, die in den entsprechenden Modulen die C-Domänen ersetzen. Da die Untersuchung dieser interessanten Domäne ein Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, soll sie im Folgenden ausführlicher beschrieben werden. Abbildung 2.9 zeigt einige Beispiele nicht-ribosomal synthetisierter Peptide, die heterozyklische Strukturen aufweisen.

Thiazoline findet man zum Beispiel im Antibiotikum Bacitracin (**2**) [Konz et al., 1997] und im Siderophor Yersiniabactin (**7**) [Miller & Walsh, 2001]. Oxazoline kommen im Vibriobactin (**12**) [Keating et al., 2000; Wyckoff et al., 1997] und im Mycobactin (**13**) [Philipp et al., 1996; Quadri et al., 1998a] vor. Auch die anderen Oxidationsstufen der Heterozyklen werden in natürlichen Produkten gefunden. So ist der heteroaromatische Thiazol-Ring ein Bestandteil des Epothilons (**5**) und des Myxothiazols (**13**) [Beyer et al., 1999; Silakowski et al., 1999]. Durch Reduktion des Heterozyklus entstehen die tetrahydrierten Oxazolidine und Thiazolidine, wie sie im Yersiniabactin (**7**) und Pyochelin (**14**) [Quadri et al., 1999; Reimann et al., 1998] gefunden werden. Ein besonders ungewöhnlicher Naturstoff ist das von *Streptomyces anulatus* 3533-SV4 produzierte Telomestatin (**11**) [Kim et al., 2002; Shin-ya et al., 2001], ein zyklisches Produkt, das aus einem Thiazolin und sieben Oxazol- bzw. β -Methyloxazol-Ringen besteht.

Bedingt durch die heterozyklischen Strukturen besitzen alle diese Verbindungen interessante biologische Eigenschaften, so ermöglichen die Heterozyklen die Chelatisierung von Metallionen oder die Interaktion mit Protein-, DNA- oder RNA-Zielmolekülen [Roy et al., 1999].

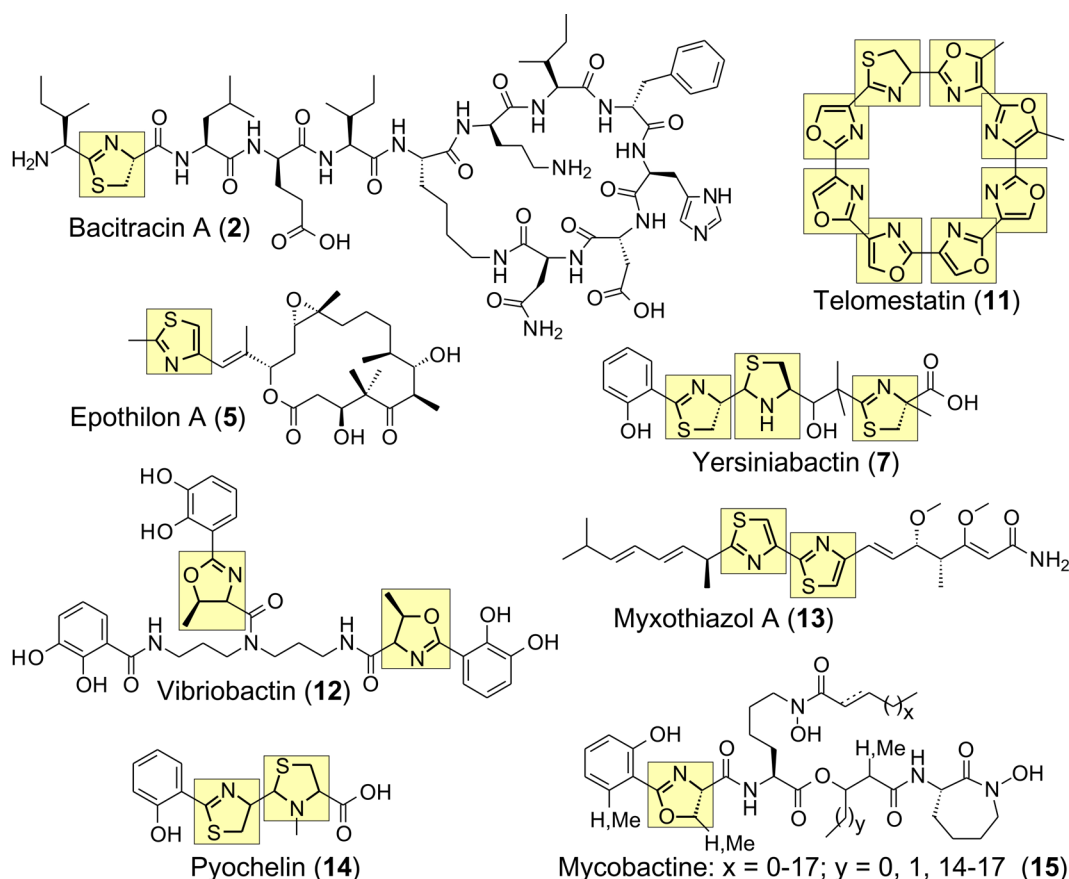


Abb. 2.9: Nichtribosomal synthetisierte, heterozyklische Produkte. Alle Oxidationsstufen der fünfgliedrigen Heterozyklen treten in nichtribosomal synthetisierten Peptiden auf. Gezeigt sind Bacitracin (2) aus *Bacillus licheniformis*, Epothilon (5) (*Sorangium cellulosum*), Yersiniabactin (7) (*Yersinia pestis*), Telomestatin (11) (*Streptomyces anulatus*), Vibriobactin (12) (*Vibrio cholerae*), Myxothiazol (13) (*Stigmatella aurantiaca*), Pyochelin (14) (*Pseudomonas aeruginosa*) und Mycobactin (15) aus *Mycobacterium tuberculosis*. Heterozyklen sind gelb unterlegt.

Zwar sind auch heterozyklische Verbindungen bekannt, die aus ribosomal synthetisierten Vorläufern gebildet werden, deren Biosynthese bzw. Heterozyklisierung ist das Ergebnis eines aufwendigen posttranslationalen Prozesses. So bilden spezielle *E. coli*-Stämme das 43 Aminosäuren umfassende Antibiotikum Microcin B17, das vier Thiazole und vier Oxazole enthält, aus einem ribosomal synthetisierten, 69 Aminosäuren umfassenden Vorläuferpeptid [Belshaw et al., 1998; Milne et al., 1998; Roy et al., 1999].

In der nichtribosomalen Peptidsynthese gestaltet sich die Bildung der heterozyklischen Ringe einfacher, da sie durch die 450 Aminosäuren umfassende Cy-Domäne während des Aufbaus des Peptidrückgrats katalysiert wird [Konz et al., 1997]. Voraussetzung ist allerdings, dass die A-Domäne des entsprechenden Moduls Cystein, Serin oder Threonin aktiviert.

Die Cy-Domänen katalysieren aufgrund ihrer besonderen Stellung mehrere Reaktionen [Roy et al., 1999]. Zunächst müssen die Substrate verbunden werden.

Diese Reaktion wird normalerweise durch die C-Domäne katalysiert, die aber in Modulen mit Cy-Domäne nicht vorhanden ist. In einem zweiten Schritt erfolgt der nucleophile Angriff auf das α -Carbonyl-C-Atom der vorangehenden Aminosäure unter Bildung des fünfgliedrigen Heterozyklus, und im dritten Schritt entsteht durch Dehydratisierung der dihydroheteroaromatische Oxazolin- bzw. Thiazolin-Ring (siehe Abb. 2.10).

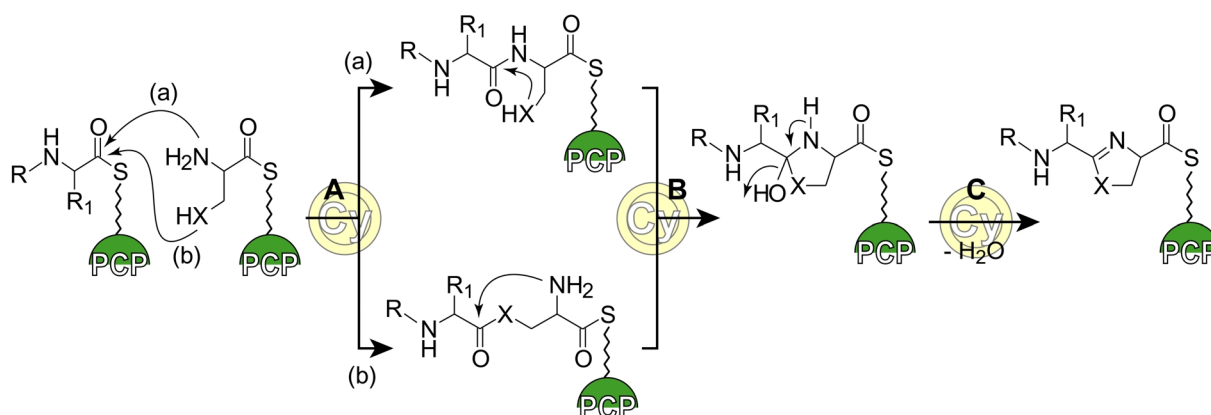


Abb. 2.10: Reaktionen der Cy-Domäne. Insgesamt drei Reaktionen werden von der Cy-Domäne katalysiert. (A) Zunächst findet die Verknüpfung der Substrate statt, die in der Bildung der Peptidbindung (a) oder eines Oxo- bzw. Thioesters (b) resultieren kann. (B) Der Ringschluss erfolgt durch den nucleophilen Angriff der Aminogruppe oder des Heteroatoms der freien Seitenkette. (C) Im letzten Schritt wird durch Dehydratisierung der Oxazolin- oder Thiazolin-Ring gebildet (X=O,S).

Der genaue Mechanismus der Heterozyklisierung ist noch unbekannt. Zwei Syntheserouten sind aber denkbar (Abb. 2.10):

a) Einerseits ist es möglich, dass im ersten Schritt die Peptidbindung geknüpft wird, gefolgt vom nucleophilen Angriff des Seitenketten-Heteroatoms auf das peptidische Carbonyl-C-Atom.

b) Andererseits kann zuerst die Bildung eines Oxoesters bzw. Thioesters erfolgen und anschließend der nucleophile Angriff der Aminogruppe auf das Carbonyl-C-Atom des Esters. Welcher Weg von der Cy-Domäne verfolgt wird war zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt.

Erste Aufschlüsse über den Katalysemechanismus gab die Untersuchung des Vibriobactin-Biosynthesesystems aus *Vibrio cholerae*. Eine ungewöhnliche Domänenorganisation (Cy-Cy-A-PCP-C-PCP) ist in der Vibriobactin-Synthetase VibF zu finden (siehe Anhang 8.3). Hier folgen zwei Cy-Domänen innerhalb eines Moduls direkt aufeinander [Keating et al., 2000]. Die Analyse dieses Systems ergab, dass die zweite Cy-Domäne (VibF-Cy2) nicht in der Lage ist, die Zyklisierungsreaktion zu

katalysieren. Allerdings kann die VibF-Cy2 die Substrate verknüpfen, ist also nicht in der Kondensationsaktivität, beeinflusst. Diese Erkenntnisse gaben erste Hinweise auf eine getrennte Katalyse von Kondensations- und Zyklisierungsreaktion [Marshall et al., 2001].

Die Position von Cy-Domänen innerhalb eines Moduls – Cy-Domänen ersetzen C-Domänen in speziellen Modulen –, das Verhalten der VibF-Cy2 und die Ähnlichkeit der Reaktionen von Cy- und C-Domänen, legen die Vermutung nah, dass es sich bei den Cy-Domänen um spezialisierte C-Domänen handelt. Dies lässt auf sequenzielle und strukturelle Verwandtschaft beider Domänentypen schließen. Allerdings besteht zwischen C- und Cy-Domänen auf Sequenzebene nur eine Ähnlichkeit von etwa 15%. Trotz der Unterschiede zeigten aber Vorhersagen der Sekundärstruktur der Cy-Domänen im Vergleich zur Kristallstruktur der VibH-C-Domäne strukturelle Übereinstimmungen zwischen beiden Domänen-Typen [Keating et al., 2002]. Danach besitzen beide die gleichen $\alpha\beta\alpha$ -sandwich-Faltungseinheiten.

2.3.3.1 Modifikation von Heterozyklen

Während die Cy-Domäne die Bildung der dihydroheteroaromatischen Oxazolin- und Thiazolin-Ringe katalysiert, werden die anderen Oxidationsstufen der Heterozyklen durch die Katalyse weiterer modifizierender Domänen gebildet [Walsh et al., 2001] (siehe Abb. 2.11). Die Oxidation zum heteroaromatischen Ring wird durch die 250 AS große Oxidations-(Ox)-Domänen sichergestellt, wie sie zum Beispiel in Enzymen der Bleomycin-, Epothilon- oder Myxothiazol-Biosynthese gefunden werden [Du et al., 2000; Schneider et al., 2003; Silakowski et al., 1999]. Interessant sind die zwei unterschiedlichen Organisationen dieser Flavin-Mononucleotid-(FMN)-abhängigen Flavoproteine. Beide Möglichkeiten werden im Myxothiazol-Biosyntheseoperon (**13**) gefunden. Die Bisthiazol-Einheit des Myxothiazols wird von zwei NRPS synthetisiert [Silakowski et al., 1999]. In der Myxothiazol-Synthetase C (MtaC) schließt sich die Ox-Domäne C-terminal an der PCP-Domäne an, während die Ox-Domäne in der Myxothiazol-Synthetase D (MtaD) eine Insertion zwischen den *core*-Motiven A8 und A9 der Cystein aktivierenden A-Domäne darstellt.

Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen der Ox-Domäne in der Epothilon-Synthetase B (EpoB) aus *S. cellulosum* zeigten, dass sie die Umsetzung des am 4'-PP-Arm gebundenen Thiazolin-Thioesters in den Thiazol-Thioester katalysiert [Schneider et al., 2003] (Epothilon-Biosynthesesystem: siehe Anhang 8.3).

Neben der oxidierten wird auch die reduzierte Form des Thiazolins, der tetrahydroheteroaromatische Thiazolidin-Ring, in nichtribosomal synthetisierten Peptiden gefunden. Die Reduktion erfolgt allerdings nicht wie bei den Ox-Domänen durch die Katalyse integrierter Domänen, sondern durch freistehende Enzyme wie beispielsweise die NADPH-abhängige Reduktase PchG des Pyochelin-Biosyntheseoperons. PchG reduziert *in trans* das enzymgebundene Thiazoliny-S-PP zum entsprechenden Thiazolidiny-S-PP [Reimann et al., 2001].

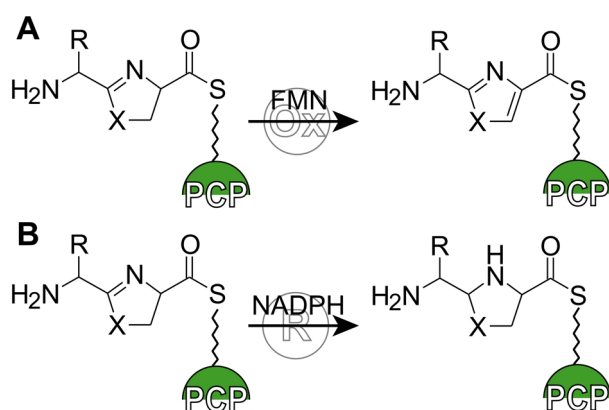


Abb 2.11: Oxidations-Stufen der Heterozyklen. (A) Ox-Domänen oxidieren FMN-abhängig die Heterozyklen zu den entsprechenden Heteroaromaten. (B) Durch NADPH-abhängige R-Domänen wird die Bildung der tetrahydro-Derivate katalysiert.

2.3.4 Optionale Domänen in der nichtribosomalen Peptidsynthese

Neben der Cy-Domäne und den Heterozyklen modifizierenden Enzymen gibt es weitere optionale Domänen, die nicht fundamental für die nichtribosomale Peptidsynthese sind, wohl aber wichtige und übliche Werkzeuge für die Produktion der Fülle an unterschiedlichen Verbindungen darstellen.

2.3.4.1 Methylierung

Eine Reihe von nichtribosomal synthetisierten Peptiden besitzen *N*-methylierte Aminosäuren. Beispielsweise sind im Cyclosporin sieben von elf Aminosäuren *N*-methyliert [Weber et al., 1994]. Die etwa 420 AS umfassenden *N*-Methylierungs- (*N*-Mt)-Domänen bilden Insertionen in den entsprechenden A-Domänen und katalysieren in einer *S*-Adenosylmethionin-(SAM)-abhängigen Reaktion die Methylierung der Aminogruppe enzymgebundener Aminoacyl-S-PP-Intermediate (siehe Abb. 2.12). Wahrscheinlich geschieht diese Reaktion vor der Bildung der Peptidbindung, wie durch Untersuchungen der Enniatin-Biosynthese gezeigt werden konnte [Haese et al., 1993; Pieper et al., 1995; Schauwecker et al., 2000]. Auch bei der Modifikation der bereits erwähnten heterozyklischen Verbindungen spielen *N*-

Methylierungen eine Rolle. So wird unter Katalyse einer *N*-Mt-Domäne während der Biosynthese des Pyochelins ein *N*-Methyl-Thiazolidin-Ring gebildet [Quadri et al., 1999; Reimann et al., 1998].

Im Biosynthesystem des Siderophors Yersiniabactin (Ybt) ist eine *N*-Mt-Domäne in die A-Domäne der Synthetase HMWP2 integriert [Gehring et al., 1998a]. Ebenfalls im Yersiniabactin-System findet sich eine C-Methylierungs-(C-Mt)-Domäne. Auch hier tritt die Methylierung im Zusammen-

hang mit der Heterozyklisierung auf. Ebenfalls SAM-abhängig wird die Methylierung am α -C-Atom des Cysteins katalysiert, was zur Bildung eines α -Methyl-Thiazolin-Rings führt [Miller & Walsh, 2001] (Abb. 2.12). Die C-Mt-Domänen des Ybt-Systems sind im Gegensatz zu den *N*-Mt-Domänen allerdings nicht in die A-Domänen integriert, sondern bilden eigenständige Domänen zwischen Cy- und PCP-Domäne.

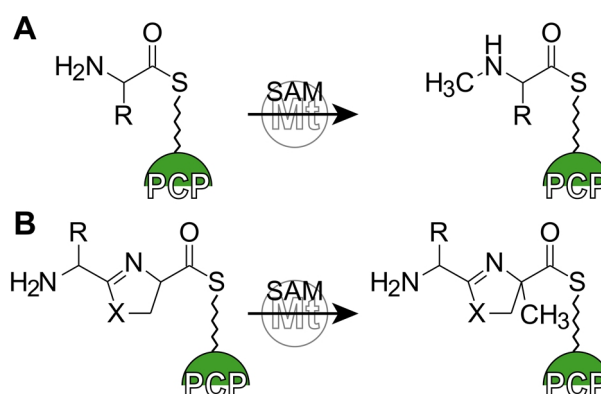


Abb. 2.12: Methylierungen. (A) Mt-Domänen katalysieren SAM-abhängig *N*-Methylierungen. (B) C-Methylierungen sind eine Möglichkeit der Modifikation von Heterozyklen.

2.3.4.2 Epimerisierung

Eine häufig zu findende Besonderheit nichtribosomal synthetisierter Peptide ist der Einbau von D-Aminosäuren. Zwar gibt es Beispiele, in denen D-Aminosäuren von A-Domänen direkt aktiviert werden, wie die Start-Aminosäure D-Alanin in der Cyclosporin-Biosynthese [Weber et al., 1994; Zocher et al., 1986], wesentlich häufiger erfolgt die Inkorporation der D-Aminosäuren aber unter Katalyse einer Epimerisierungs-(E)-Domäne. Diese 450 AS großen Domänen, die strukturell den C-Domänen ähnlich sind [Keating et al., 2002], schließen sich C-terminal an die PCP-Domänen der entsprechenden Module an. Dabei katalysieren sie die Racemisierung am α -C-Atom der enzymgebundenen Aminacyl- bzw. Peptidyl-S-PP-Reste durch De- und Reprotonierung [Stachelhaus & Walsh, 2000] (siehe Abb. 2.13). Aufgrund

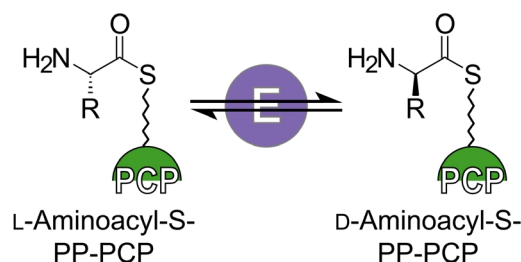


Abb. 2.13: Reaktion der E-Domäne. Die E-Domäne katalysiert die Racemisierung des Aminoacyl-S-PP.

der katalysierten Reaktion wird zwischen Aminoacyl-E-Domänen und Peptidyl-E-Domänen unterschieden [Luo et al., 2002]. Streng genommen handelt es sich bei den E-Domänen allerdings um Racemasen, da sie lediglich ein racemisches Gemisch aus L- und D-Enantiomer bzw. L- und D-Diastereomer bilden. Die Selektivität bezüglich des ins Polypeptid eingebauten Isomers liegt daher nicht bei der E-Domäne selbst, sondern ist bestimmt durch die Selektivität der C-Domäne des folgenden Moduls [Belshaw et al., 1999; Linne et al., 2001].

2.3.4.1 Weitere Modifikationen

Noch nicht aufgeklärt ist die Lipoinitiation in der Surfactin- und Fengycin-Biosynthese. In beiden Fällen wird die Polypeptidkette N-terminal an eine Fettsäure gebunden. Wahrscheinlich wird die Bindung zwischen der Fettsäure und der ersten Aminosäure durch die ungewöhnlichen Initiationsmodule katalysiert, die eine N-terminale C-Domäne besitzen [Cosmina et al., 1993; Steller et al., 1999].

Ebenfalls eine Modifikation am N-Terminus der Peptidkette ist die N-Formylierung der ersten Aminosäure, die wahrscheinlich durch Formyltransferasen mithilfe des Cofaktors N-Formyltetrahydrofolat katalysiert wird. N-Formylierungen und die entsprechenden putativen modifizierenden Domänen sind Bestandteil der Biosynthese des Anabaenopeptilids 90-A und des linearen Gramacidins [Rouhiainen et al., 2000; Kessler & Marahiel, 2003].

Neben den beschriebenen Methoden zur Veränderung während der Peptidsynthese, werden nichtribosomal synthetisierte Peptide in einigen Fällen auch durch postsynthetisch wirkende Enzyme modifiziert. Beispiele für diese Enzyme sind die Glycosyltransferasen, die unter anderem in der Vancomycin-Synthese die Kondensation von Zuckerresten am phenolischen Sauerstoffatom eines Hydroxyphenylglycins katalysieren [Hubbard & Walsh, 2003; Losey et al., 2001; Walsh et al., 2001]. Andere Glycopeptide, die auf nichtribosomaler Synthese beruhen, sind das Bleomycin [Shen et al., 2002] und das Novobiocin [Steffensky et al., 2000]. Ebenfalls in der Vancomycin-Biosynthese auftretende Halogenierungen werden wahrscheinlich durch Halogenasen katalysiert. [Hubbard & Walsh, 2003]. Der Mechanismus der Bildung der 3-Chloro-4-Hydroxyphenylglycine ist aber noch nicht aufgeklärt.

2.3.5 NRPS/PKS-Hybridsysteme

Eine zweite wichtige Gruppe der Naturstoffe bilden die Polyketide. Unter ihnen finden sich ebenfalls Antibiotika, Immunsuppressiva und Zytostatika. Wie bei den NRPS erfolgt die Biosynthese der Polyketide bei den Typ I Polyketid-Synthasen (PKS) an multimodularen Enzymen [Cane & Walsh, 1999; Staunton & Weissman, 2001]. Jedes Modul ist für die Integration einer Acetat- oder Propionat-Einheit in die Ketidkette verantwortlich, wobei der

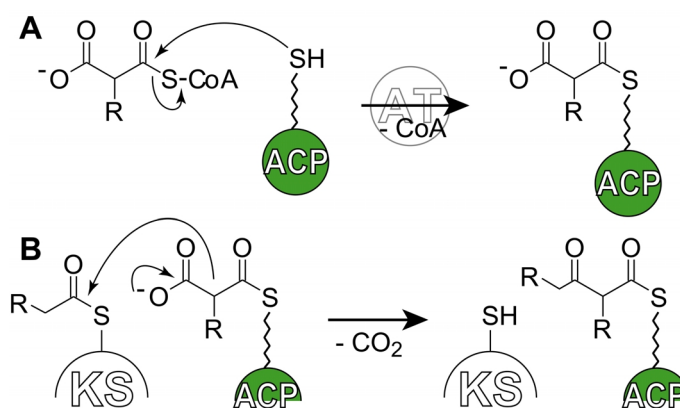


Abb. 2.14: Reaktionen der Polyketidsynthese. (A) Die AT-Domäne katalysiert den Transfer des Substrats auf das ACP. (B) KS-Domänen katalysiert unter Decarboxylierung die Kettenverlängerung

Modul-Aufbau deutliche Parallelen zu den NRPS aufweist [Schwarzer & Marahiel, 2001] (siehe Abb. 2.14). Die Acetyltransferase-(AT)-Domäne katalysiert den Transfer aktivierter Substrate auf die zugehörige *acyl-carrier*-Protein-(ACP)-Domäne. Die Elongationsreaktion wird durch die Ketosynthase-(KS)-Domäne katalysiert, nachdem die Ketidkette vom ACP des vorangehenden Moduls auf ein Cystein im aktiven Zentrum übertragen wurde [Reid et al., 2003]. Unter Decarboxylierung der Malonyl-Einheit auf dem moduleigenen ACP erfolgt ein nucleophiler Angriff auf die in der KS-Domäne gebundene Ketidkette und damit die Kettenverlängerung.

Wie bei den meisten NRPS erfolgt die Termination der Biosynthese durch eine C-terminale Te-Domäne. Modifikationen am Polyketidrückgrat werden durch optionale Domänen, wie Ketoreduktase-(KR)-, Dehydratase-(DH)- und Enoylreductase-(ER)-Domänen, katalysiert.

Die Gemeinsamkeiten von NRPS und PKS legen Kombinationen beider multimodularen Enzyme nahe, und tatsächlich werden immer mehr gemischte Cluster gefunden, in denen Gene beider Systeme organisiert sind [Cane & Walsh, 1999; Hutchinson, 2003]. Die Biosynthese des Epothilons (**5**) zum Beispiel erfolgt in einem solchen NRPS/PKS-Hybridsystem [Molnar et al., 2000; Tang et al., 2000] (vgl. Anhang 8.3). Die Bildung des Thiazol-Rings wird durch ein NRPS-Modul mit der Domänenorganisation Cy-A(Ox)-PCP katalysiert, wobei die Ox-Domäne in die A-Domäne integriert ist. Der Makrolacton-Ring des Epothilons ist das Produkt von

insgesamt vier Polyketid-Synthasen. Ein besonders System katalysiert die Biosynthese des Myxothiazols (**13**) [Silakowski et al., 2001; Silakowski et al., 1999]. Bilden im Epothilon die NRPS bzw. PKS eigenständige Enzyme, findet man in der Myxothiazol-Synthetase D (MtaD) einen Übergang von NRPS zu PKS innerhalb eines Enzyms. Andere bekannte Beispiele für NRPS/PKS-Hybride sind die Biosynthesesysteme des Mycobactins (**15**) [Quadri et al., 1998a] und des Yersiniabactins (**7**) [Miller & Walsh, 2001] (vgl. Anhang 8.3).

2.4 Das Peptidantibiotikum Bacitracin

Um das Prinzip und die Organisation der NRPS zu verdeutlichen, wird im Folgenden die Biosynthese des Peptidantibiotikums Bacitracin genauer beschrieben. Spezielle Stämme von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* produzieren ein Gemisch von 15 verschiedenen Bacitracin-Derivaten [Azevedo et al., 1993; Haavik & Froyshov, 1975], dessen Hauptbestandteil das Bacitracin A ist. Es besteht aus einer N-terminalen Pentapeptidkette und einem C-terminalen, aus sieben Aminosäuren bestehenden Lactam-Ring [Ikai et al., 1992]. Als strukturelle Besonderheiten enthält das Bacitracin vier D-konfigurierte Aminosäuren und die nichtproteinogene Aminosäure Ornithin. Auffälligstes Merkmal ist allerdings der Thiazolin-Ring, der aus den ersten beiden Aminosäuren, Isoleucin und Cystein, gebildet wird [Ishihara & Shimura, 1979; Ishihara & Shimura, 1988].

Die antibiotische Wirkung des Bacitracins beruht auf der Inhibierung der Zellwandbiosynthese Gram-positiver Bakterien. Als *carrier* für Murein- bzw. Peptidoglykan-Einheiten durch die Zellmembran dient in Gram-positiven Zellen das membrangebundene C₅₅-Isoprenylpyrophosphat (IPP). Bacitracin kann bei Anwesenheit zweiwertiger Metallionen wie Mn²⁺ oder Zn²⁺ das IPP komplexieren und dadurch dessen notwendige Dephosphorylierung unterbinden, wodurch die Zellwandbiosynthese zum Erliegen kommt [Stone & Strominger, 1971; Storm & Strominger, 1973]. Zentraler Bestandteil des Bacitracins für die antibiotische Wirksamkeit ist der erwähnte Thiazolin-Ring, da er an der Bildung des Komplexes mit IPP und dem Metallion beteiligt ist. Zusätzliche inhibitorische Wirkung kann Bacitracin auf die Peptidbiosynthese, auf Membranfunktionen und auf Hydrolasen ausüben [Makinen, 1972; Rieber et al., 1969; Schechter et al., 1972]. Zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten wurde Bacitracin in Kombination mit anderen Antibiotika eingesetzt [Brunner, 1965].

Heute findet es vor allem lokale Anwendung bei Wundinfektionen, Verbrennungen oder Hauttransplantationen.

2.4.1 Die Biosynthese des Bacitracins

Das Biosynthesesystem des Bacitracins wurde aus verschiedenen Gründen ausgewählt, um hier das Prinzip der NRPS zu veranschaulichen. Zum einen ist es ein gut untersuchtes Beispiel für den linearen Ablauf der Peptidsynthese. Jedes Modul ist für den Einbau einer Substrataminosäure verantwortlich. Zum anderen befindet sich im zweiten Modul der Bacitracin-Synthetase A (BacA) eine Cy-Domäne. Diese war Ausgangspunkt der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Heterozyklisierung. Außerdem zeigt Bacitracin mit den D-Aminosäuren und dem nichtproteinogenen Ornithin weitere typische Merkmale nichtribosomal synthetisierter Peptide. Die Bacitracin-Biosynthese wird von drei Enzymen, BacA, BacB und BacC, katalysiert, deren codierende Gene, *bacA*, *bacB* und *bacC*, in einem Gen-Cluster organisiert sind [Konz et al., 1997] (siehe Abb. 2.15).

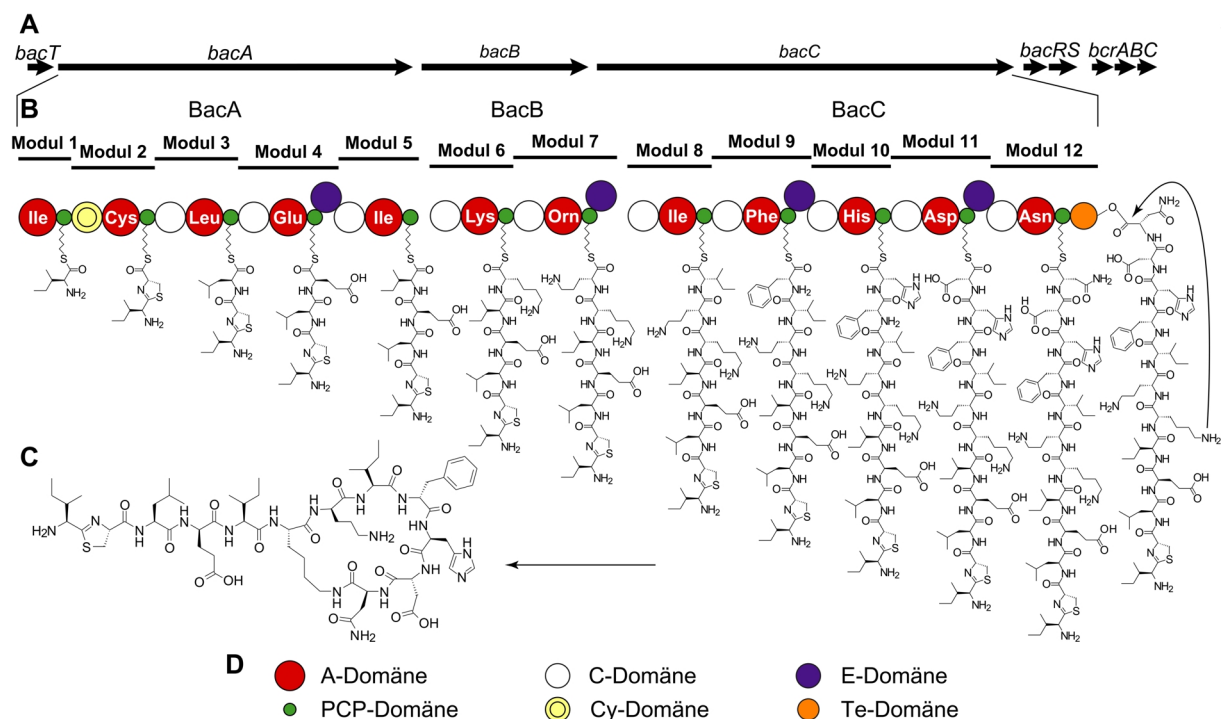


Abb. 2.15: Nichtribosomale Synthese des Peptidantibiotikums Bacitracin in *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. (A) Die in einem Gen-Cluster organisierten Bacitracin-Synthese-Gene *bacA*, *bacB* und *bacC* codieren die Bacitracin-Synthetasen BacA, BacB und BacC (B). Zwölf Module katalysieren die Synthese. Optionale E-Domänen sind verantwortlich für den Einbau von vier D-Aminosäuren. Die Cy-Domäne im zweiten Modul katalysiert die Bildung des Thiazolin-Rings. Die C-terminale Te-Domäne setzt unter Zyklisierung das verzweigt-zyklische Produkt Bacitracin (C) frei. (D) Farbcodierung der katalytischen Domänen.

Die Produktion wird durch das erste von fünf Modulen der Synthetase BacA, welche die Bildung des linearen Teils des Bacitracins katalysiert, initiiert. BacB und BacC katalysieren die Bildung des C-terminalen Heptapeptids, wobei BacB nur aus zwei Modulen und BacC aus fünf Modulen besteht. Die Biosynthese wird durch die Te-Domäne des letzten Moduls terminiert. Die Produktfreisetzung geschieht durch Bildung des Lactam-Rings, der durch einen nucleophilen Angriff der ϵ -Aminogruppe des Lysins an Position sechs auf das α -Carbonyl der letzten Aminosäure Asparagin entsteht.

Stromabwärts der Synthetasen-Gene liegen die codierenden Gene des Zweikomponentensystems BacRS und des ABC-Transporters BcrABC, beide sind wichtig für die Eigenresistenz des Produzenten [Eppelmann et al., 2001; Neumüller et al., 2001]. Im gleichen Gen-Cluster befindet sich stromaufwärts das *bacT*-Gen, das für eine Typ II-Thioesterase (TEII) codiert [Schneider & Marahiel, 1998]. Diese TEII wurden in verschiedensten NRPS-Operons identifiziert. Sie fungieren als „Reinigungs-Enzyme“, die den Thioester der 4'-PP-Cofaktoren fehlbeladener PCP-Domänen [Schwarzer et al., 2002] spalten.

2.5 Entwicklung und Design neuer NRPS

Die pharmakologische Bedeutung der Naturstoffe sowie die Entwicklung von Resistenzen erfordern die ständige Weiterentwicklung von Wirkstoffen. Der modulare Aufbau und die Domänenorganisation der NRPS erlauben im Besonderen deren gezielte Veränderung sowie das rationale Design neuer Enzyme [Cane et al., 1998; Rodriguez & McDaniel, 2001; Stachelhaus et al., 1995; Walsh, 2002].

Die Erkenntnisse früherer Untersuchungen zur Generierung artifizieller Peptidsynthetasen bilden die Grundlage der in dieser Arbeit beschriebenen Konstruktionen von Hybridenzymen.

Mit Hilfe der Strukturaufklärung der wichtigsten Domänen (C-, A-, PCP-, Te-Domäne) konnten durch Sequenzvergleiche deren Grenzen festgelegt werden. Die einzelnen Domänen sind durch sogenannte Linkerregionen miteinander verbunden. Diese sind kurze, bis zu 15 Aminosäuren umfassende Bereiche, die kaum Konservierungen aufweisen und überwiegend aus kleinen, hydrophoben Aminosäuren bestehen [Dieckmann et al., 1999; Doekel, 2000; Mootz et al., 2000]. Die Linkerregionen bieten ideale Voraussetzungen für gezielte Veränderungen des

Enzym-Templats, da Modifikationen in diesem Bereich nur geringen Einfluss auf die enzymatische Aktivität haben sollten. Durch artifizielle Fusionsstellen innerhalb der Linker lassen sich also Module und Domänen gezielt verbinden und so zu neuen, hybriden Synthetasen kombinieren. Grundsätzlich sind verschiedene Strategien der Domänen- und Modulfusionen möglich [Mootz & Marahiel, 1999]. Ihre Praktikabilität wurde durch Untersuchungen an zumeist di- oder trimodularen Hybridsynthetasen nachgewiesen [Doekel, 2000; Doekel & Marahiel, 2000; Mootz et al., 2000] (siehe Abb. 2.16).

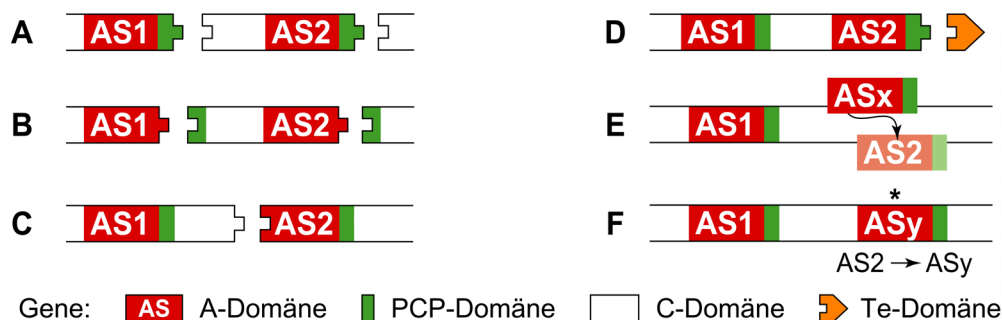


Abb. 2.16: Strategien zur Konstruktion künstlicher NRPS. Das Design artifizieller NRPS beruht auf der gezielten Veränderung der codierenden Gene. Verschiedene Strategien wurden erfolgreich angewendet: (A) Modul- und Domänenfusionen zwischen PCP- und C-Domäne, (B) zwischen A- und PCP-Domäne oder (C) zwischen C- und A-Domäne werden genutzt. (D) Durch künstliche Fusion von Te-Domänen kann die Produktfreisetzung hybrider Synthetasen sichergestellt werden. (E) Der Austausch von A-PCP-Modulen führt zur Produktion veränderter Peptide. (F) Durch gezielte Mutationen in A-Domänen kann deren Selektivität verändert werden.

Im Gegensatz zu Fusionen innerhalb der Interdomänen-Linker führten Fusionen, die innerhalb der Domänen in hochkonservierten Bereichen durchgeführt wurden, häufig zu inaktiven Enzymen [Elsner et al., 1997; Symmank et al., 1999].

Aufgrund der Akzeptor-Selektivität der C-Domäne wurden Module als Einheiten von C-, A- und PCP-Domäne definiert. Bei der Konstruktion hybrider NRPS sollte also die Verbindung zwischen den nativ zusammengehörigen C- und A-Domänen intakt bleiben, da ansonsten die Selektivität der Akzeptor-Position die enzymatische Aktivität beeinflussen könnte [Mootz et al., 2000]. Trotzdem konnten auch aktive Hybridenzyme mit artifiziellen Fusionen zwischen C- und A-Domäne konstruiert werden [Doekel, 2000].

Neben der Verwendung der *core*-Domänen C, A, und PCP können auch die optionalen Domänen für die Konstruktion hybrider Peptidsynthetasen eingesetzt werden. Diesbezügliche Untersuchungen mit E-Domänen haben allerdings gezeigt, dass die den E-Domänen benachbarten PCP-Domänen spezielle Sequenzunterschiede aufweisen, sodass E-Domänen-Fusionen ebenfalls einen Austausch

des PCPs voraussetzen [Linne et al., 2001]. Außerdem besitzen C-Domänen eine Enantioselektivität für den Aminoacyl- bzw. Peptidyl-Donor. Bei Fusionen zwischen E- und C-Domäne muss also auch auf diese Selektivität geachtet werden.

Eine andere, in artifizielle Systeme integrierte ist die N-Mt-Domäne [Schauwecker et al., 2000]. Insgesamt sind aber die Möglichkeiten der optionalen Domänen in Hybridenzymen wenig untersucht.

Die Produktabspaltung kann in artifiziiellen NRPS, genauso wie in den natürlichen Systemen, durch C-terminale Te-Domänen sichergestellt werden [Schwarzer et al., 2001]. Neben den *in vitro*-Untersuchungen konnte auch *in vivo* die Aktivität einer künstlich fusionierten Te-Domäne nachgewiesen werden. Durch die Fusion der Te-Domäne des siebten Moduls des Surfactin-Biosynthesesystems an den C-Terminus des vierten bzw. fünften Moduls konnte eine Produktabspaltung erreicht werden, die zur Bildung verkürzter Surfactin-Derivate führte [de Ferra et al., 1997].

Die Veränderung der Biosynthesesysteme für die *in vivo*-Produktion neuer Verbindungen ist ein weiteres, wichtiges Gebiet der Wirkstoffentwicklung. Am Beispiel des Surfactins konnte der Austausch bzw. die Deletion von Modulen *in vivo* gezeigt werden. Die Deletion des zweiten Moduls der Surfactin-Synthetase B führte zur Produktion eines verkürzten Surfactin-Derivats [Mootz et al., 2002a]. Auch durch den Austausch von A-PCP-Einheiten in den Modulen 2 und 7 der Surfactinsynthetasen konnten veränderte Surfactin-Derivate erhalten werden [Schneider et al., 1998; Stachelhaus et al., 1995].

Da die Selektivität der A-Domäne hauptsächlich durch die zehn Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche determiniert wird [Stachelhaus et al., 1999] (vgl. Anhang 8.2), stellt die gezielte Veränderung dieser Reste eine weitere Methode zur Entwicklung neuer Synthetasen dar. Es konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen der substratkoordinierenden Aminosäurereste zu den gewünschten, veränderten Aktivitäten führen [Stachelhaus et al., 1999]. Die Veränderung der Substratselektivität der A-Domäne des zweiten Moduls der Surfactin-Synthetase B von Asparat zu Asparagin konnte durch die Substitution nur eines Restes (His322 zu Glu) erreicht werden. Der so manipulierte *Bacillus subtilis*-Stamm ist in der Lage, das an der Position 5 veränderte Surfactin-Derivat zu produzieren [Eppelmann et al., 2002].

2.5 Aufgabenstellung

Die verschiedenen bekannten Strategien der Domänen- und Modulfusionen zeigen das biokombinatorische Potential der nichtribosomalen Peptidsynthetasen. Im Rahmen dieser Dissertation sollten dimodulare Hybridsynthetasen entwickelt werden, die als enzymatisches Templat für die Synthese des Dipeptids α -L-Aspartyl-L-Phenylalanin (Asp-Phe) dienen. Asp-Phe ist die Vorläuferverbindung für den Süßstoff Aspartam. Ziel war das rationale Design eines möglichst effizienten Systems für die Produktion dieser industriell interessanten Verbindung. Durch Anwendung der bekannten Strategien sollten die Möglichkeiten der unterschiedlichen Fusionen zum ersten Mal an einem System verglichen und ihre Auswirkungen auf die Produktivität der Hybridenzyme untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Heterozyklisierungs-(Cy)-Domäne. Ausgehend vom Bacitracin-Biosyntheseoperon sollte ein einfaches Modellsystem entwickelt werden, das die *in vitro*-Analyse dieser speziellen, modifizierenden Domäne ermöglicht. Ausgehend von diesem Modellsystem sollten Untersuchungen zu Domänen- und Modulfusionen mit der Cy-Domäne durchgeführt werden. Außerdem sollte das Modellsystem dazu dienen, durch Mutationsanalyse Einblicke in den bislang unbekannten Reaktionsmechanismus der Cy-Domäne zu erhalten.

3 Material

3.1 Geräte

Tab. 3.1 Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller und Typenbezeichnung |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Autoklav | <i>Tuttnauer</i> 5075 ELV |
| DNA-Agarosegel-Dokumentation | Videokamera <i>Cybertech</i> CS 1 Thermodrucker <i>Mitsubishi</i> Video Copy Processor |
| DNA-Sequenzier | <i>PE Applied Biosystems</i> ABI PRISM 310 Genetic Analyzer |
| Elektroporationspulser | <i>Biorad</i> Gene Pulser II |
| ESI-MS-System | <i>Hewlett Packard</i> Series 1100 |
| FPLC-Säulen | <i>Amersham Biosciences</i> High-Trap Desalting <i>Amersham Biosciences</i> Chelating-Column HR 10/2 |
| FPLC-System | <i>Pharmacia</i> FPLC-System: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500, Uvicord Optische Einheit UV-1, Uvicord Kontrolleinheit UV-1, Injektionsventil V-7, 3-Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100, 2-Kanal-Flachbettschreiber REC-102, |
| Schüttelinkubator | <i>Eppendorf</i> Thermomixer Comfort |
| HPLC-Säule | <i>Macherey-Nagel</i> C250/3 Nucleosil 120-3 C18 |
| HPLC-System | <i>Agilent</i> Series 1100 HPLC-System: DAD-Detektor, Vakuumentgaser, quaternäre Pumpe, Autosampler, HP-Chemstation |
| Luftschüttler | <i>New Brunswick Scientific</i> Series 25 Incubator Shaker <i>New Brunswick Scientific</i> Innova 4300 Incubator Shaker |
| Photometer | <i>Pharmacia</i> Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer |
| Reinstwasseranlage | <i>Seral</i> Seralpur Pro 90 CN |
| Speed-Vac | <i>Uniequip</i> Univapo 150 H |
| Szintillationszähler | <i>Packard</i> 2100 TR Tri-CARB Liquid Scintillation Analyzer |
| Thermocycler | <i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal <i>Perkin Elmer</i> GeneAmp PCR System 2400 <i>Perkin Elmer</i> GeneAmp PCR System 9700 |
| Wasserbad | <i>Infors</i> Aquatron Rundschüttelmaschine |

| Gerät | Hersteller und Typenbezeichnung |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zellaufschluß | <i>SLM Aminco</i> French Pressure Cell Press |
| Zentrifugen | <i>Eppendorf</i> Centrifuge 5415D <i>Heraeus</i> Mikrofuge pico, <i>Heraeus</i> Mikrofuge RF, <i>Heraeus</i> Megafuge 1.0R <i>Sorvall</i> RC 26 Plus, <i>Sorvall</i> RC 5B Plus |

3.2 Chemikalien, Enzyme, Laborprodukte

In Tabelle 3.2 nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen *Aldrich* (Steinheim), *Merck* (Darmstadt) oder *Sigma* (Deisenhofen) bezogen.

Tab. 3.2 Verwendete Chemikalien, Enzyme, Laborprodukte

| Hersteller | Produkt |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Amersham Biosciences Europe</i> (Freiburg) | Lysozym, Ampicillin, Kanamycin, Hefeextrakt, IPTG, Proteinase K, RNase A, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr.1 |
| <i>AppliChem</i> (Darmstadt) | Hefeextrakt, Tryptone, IPTG |
| <i>Eurogentech</i> (Seraing, Belgien) | Agarose, Elektroporationsküvetten |
| <i>Fluka</i> (Neu-Ulm) | SDS |
| <i>Hartmann-Analytik</i> (Braunschweig) | [³ H]- und [¹⁴ C]-markierte Aminosäuren |
| <i>ICN-Biomedicals, Inc.</i> (Eschwege) | [¹⁴ C]-markierte Aminosäuren |
| <i>Kodak</i> (Rochester, USA) | Röntgenfilm Biomax MR |
| <i>Macherey-Nagel</i> (Düren) | Nucleospin Extract |
| <i>Millipore</i> (Schwalbach) | Amicon Ultra |
| <i>MWG-Biotech</i> (Ebersberg) | Oligonukleotide |
| <i>NEN Life Science Products</i> (Köln) | [³² P]-markiertes Pyrophosphat |
| <i>New England Biolabs</i> (Frankfurt a.M.) | Restriktionsendonukleasen |

| | |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Oxoid</i> (Wesel) | Agar Nr. 1, Trypton |
| <i>Qiagen</i> (Hilden) | Ni ²⁺ -NTA Agarose, QIAexpress Vector Kit ATG, QIAquick-spin PCR Purification Kit, QIAEX II Purification Kit, tip 20/100-Anionenaustauschersäulen, |
| <i>Qiagen-Operon</i> (Köln) | Oligonukleotide |
| <i>Roche</i> (Mannheim) | Expand long template PCR system |
| <i>Roth</i> (Karlsruhe) | Ethidiumbromid, Rotizint Eco Plus, Acrylamidlösung, β -Mercaptoethanol |
| <i>Schleicher & Schüll</i> (Dassel) | Sterilfilter (0,45 μ m), Mischestermembranfilter M25 (0,2 μ m) |
| <i>Serva</i> (Heidelberg) | Bromphenolblau, Xylencyanol, Dialyseschlauch |
| <i>Stratagene</i> (Heidelberg) | QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit |

3.3 Vektoren

3.3.1 pQE60

Für die Expression der NRPS-Gene in *E. coli* wurde unter anderem der pQE60-Vektor (3431 bp) (*Qiagen*, Hilden) genutzt. Dieser, der pDS-Familie angehörige Vektor basiert auf dem Plasmid pDS56/RBSII [Bujard et al., 1987; Stüber et al., 1990]. Er besitzt den *E. coli* T5-Phagenpromotor P_{N25} [Gentz & Bujard, 1985], zwei *lac*-Operatorerkennungssequenzen sowie eine *E. coli*-optimierte synthetische ribosomale Bindungsstelle RBSII. Außerdem enthält er den *E. coli* Replikationsursprung ColE1 aus pBR322 [Scutcliffe, 1979]. Die *multiple-clonig-site* (MCS) wird durch die Restriktionsschnittstellen *Nco*I, *Bam*HI und *Bgl*II gebildet. Das ATG-Startcodon ist Bestandteil der Erkennungssequenz der *Nco*I-Restriktionsschnittstelle. Stromabwärts der MCS befindet sich die Sequenz für den His₆-tag und direkt anschließend Stopcodons in den drei Leserahmen. Die Expression von Genen, die in die MCS kloniert wurden, führt zur Produktion von Proteinen mit C-terminalem His₆-tag. Die Transkription wird durch den Transkriptionsterminator t₀ des λ -Phagen terminiert. Durch die Expression des β -Lactamasegens *bla* vermittelt der pQE60-Vektor Resistenz gegen Ampicillin.

3.3.2 pQE70

Wie der pQE60-Vektor gehört auch der pQE70 zur Familie der pDS-Plasmide. Dieser 3426 bp umfassende Vektor enthält die gleichen Komponenten wie der oben beschriebene pQE60. Einziger Unterschied ist die MCS, die sich im Fall des pQE70 aus den Restriktionsschnittstellen *SphI*, *BamHI* und *BglII* zusammensetzt. Das ATG-Startcodon ist Bestandteil der *SphI*-Erkennungssequenz. Expressionen von Genen im pQE70-Vektor führen ebenfalls zur Produktion von Proteinen mit C-terminalem His₆-tag.

3.3.3 pREP4

Das pREP4-Plasmid (3740 bp) (Qiagen, Hilden) wird als Helferplasmid bei der Expression eingesetzt. Neben dem *neo*-Gen, das Resistenz gegen Kanamycin vermittelt, trägt es das *lacI*-Gen, welches für den Lac-Repressor codiert [Farabough, 1978]. Durch die Lac-Repressorproduktion kann das pREP4-Plasmid zur Regulation der Expression von Genen in pQE-Derivaten genutzt werden. Der Replikationsursprung P15A ist kompatibel zum ColE1, sodass das pREP4-Plasmid zusammen mit den pQE-Vektoren in *E. coli* repliziert werden kann.

3.3.4 pREP4[gsp]

Das pREP4[gsp]-Plasmid ist ein Derivat des pREP4. Durch Coexpression des integrierten *gsp*-Gens wird die Produktion der PPTase Gsp des Gramicidin S Biosynthesystems ermöglicht. Das *gsp*-Gen steht dabei unter der Kontrolle des T7-Promotors [Studier & Moffatt, 1986]. Die Produktion der PPTase Gsp ermöglicht die Modifikation der *carrier*-Proteine der produzierten NRPS-Proteine *in vivo* [Doekel, 2000].

3.4 Mikroorganismen

3.4.1 *E. coli* XL1-Blue

Klonierungsarbeiten wurden mit dem *E. coli* XL1-Blue-Stamm (*Stratagene*) oder dem nachfolgend beschriebenen *E. coli* XL10-Gold-Stamm durchgeführt. *E. coli* XL1-Blue besitzt den Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI^f*ZDM15 Tn10 (Tet^r)] [Bullock et al., 1987].

3.4.2 *E. coli* XL10 Gold

Alternativ wurde auch der *E. coli* XL10 Gold-Stamm (Stratagene) mit dem Genotyp Tet^r *D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI^qZDM15 Tn10* (Tet^r) *Amy Cam^r*]^a verwendet.

3.4.3 *E. coli* BL21(λ DE3)

Für die Expression der rekombinanten NRPS-Gene wurde überwiegend der *E. coli* BL21/pREP4[gsp]-Stamm verwendet, ein Derivat des *E. coli* BL21(λ DE3) mit dem Genotyp F^- , *dcm*, *hsdS* $r_B^-m_B^-$, *ompT*, *gal* [Chambers, 1987]. Diesem Stamm fehlen die Proteasen *lon* und *OmpT* [Grodberg & Dunn, 1988]. Zusammen mit *lacZ* und dem Promotor *lacV5* ist das Gen der T7-Polymerase auf einem Prophagen ins Chromosom integriert [Studier & Moffatt, 1986].

E. coli BL21/pREP4[gsp] trägt zusätzlich das Plasmid pREP4[gsp] (vgl. 3.3.4).

3.4.4 *E. coli* M15

Ebenfalls für Expressionen wurde der *E. coli* M15-Stamm mit dem Genotyp *ara*, *gal*, *lacI*, *mtl*, *nal^s*, *rif^s*, *str^s*, F^- verwendet [Zamenhof & Villarejo, 1972]. Im Gegensatz zum *E. coli* BL21(λ DE3)-Stamm besitzt dieser keine T7-Polymerase, sodass eine Coexpression des *gsp* auf dem pREP4[gsp]-Plasmid nicht möglich ist.

3.4.5 *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Wildtyp-Stamm, Surfactin-Produzent [Cooper et al., 1981].

3.4.6 *Bacillus brevis* ATCC 8185

Wildtyp-Stamm, Tyrocidin-Produzent [Mootz & Marahiel, 1997].

3.4.7 *Bacillus licheniformis* ATCC 10716

Wildtyp-Stamm, Bacitracin-Produzent [Johnson et al., 1945].

3.5 Medien

Für die Anzucht der verwendeten Mikroorganismen wurde ausschließlich LB- oder 2xYT-Medium verwendet [Sambrook et al., 1989]. Festmedium wurde durch Zugabe von 1,2% Agar Nr.1 vor dem Autoklavieren (121°C, 1,5 bar, 20 min) hergestellt.

| | | |
|--------------------|--------------|--------|
| LB-Medium | Bactotrypton | 10 g/L |
| | Hefeextrakt | 5 g/L |
| | NaCl | 5 g/L |
| 2xYT-Medium | Bactotrypton | 16 g/L |
| | Hefeextrakt | 10 g/L |
| | NaCl | 5 g/L |

Bei Expressionen wurden gegebenenfalls 10 mM MgCl_2 zugesetzt, um die Löslichkeit der produzierten Proteine zu erhöhen. Nach Bedarf wurden dem Medium Antibiotika in den Standardkonzentrationen 100 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin und 25 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin zugesetzt.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

Ein Großteil der in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Methoden sind etablierte und veröffentlichte Standardtechniken [Sambrook et al., 1989]. Aus diesem Grund werden in diesem Abschnitt nur die Konstruktionen der Plasmide und von den Standardmethoden abweichende Techniken beschrieben.

4.1.1 Konstruktion der Plasmide

Die für die Klonierung erforderlichen Genfragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung des „Expand long template PCR system“ (Roche, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers amplifiziert. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme wurden durch synthetische Oligonukleotide eingeführt (MWG-Biotech, Ebersberg; Qiagen-Operon, Köln). Die Reinigung der PCR-Ansätze erfolgte mit dem „QIAquick-spin PCR Purification Kit“, dem „QIAEX II Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) oder dem „Nucleospin Extract Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben der Hersteller. Die ortsgerichtete Mutagenese der Cy-Domäne erfolgt mit dem „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers. Chromosomale DNA, die als Templat für die PCR diente, wurde mittels Anionenaustauscherchromatographie mit „tip-100 Säulen“ (Qiagen) gereinigt [Vogelstein & Gillespie, 1979]. Die Präparation der Plasmide aus den *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim & Doly, 1979]. Die Richtigkeit der konstruierten Plasmide wurde durch Restriktionsverdaue und DNA-Sequenzierung verifiziert.

4.1.1.1 Plasmide des Asp-Phe-Projekts

Als Template für die Amplifikation der nötigen Genfragmente der Asp-Phe-Plasmide diente chromosomale DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 oder *B. brevis* ATCC 8185. Alle Plasmide basieren auf dem pQE Vektor-System (Qiagen, Hilden). In den Bezeichnungen rekombinanter Genfragmente sind Gene, die für nativ zusammengehörige Domänen codieren in eckigen Klammern zusammengefasst. In den Indizes ist der Ursprung der Gene angegeben (z.B. p[A-PCP]_{srfB2}-[C-A-PCP]_{tycB2}-[Te]_{tycC6}). Die Asp-Phe-Plasmide, die für die Produktion der Asp-Phe-Synthetasen

verwendet wurden, sind entsprechend den Synthetasen Asp-Phe-I bis VI nummeriert von pAsp-Phe1 bis pAspPhe-6.

pAspPhe-1: Das Plasmid pAspPhe-1 basiert auf dem pQE70-Vektor. Das DNA-Fragment [A-PCP-C-A-PCP]_{srfB2-3}, welches für die Domänen A-PCP-C-A-PCP der Module 2 und 3 der Surfactin-Synthetase B (SrfB2-3) codiert, wurde mit den Oligonukleotiden 5'AspLeu(Sph)srfB2 5'- TAA **GCA TGC** TGC TTT CAT CTG CAG AAA C -3' und 3'AspLeu(BamHI)srfB3 5'- AAT **GGA TCC** TTC GGC ACG CTC TAC -3' (Restriktionsschnittstellen in fett) aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert. Nach Verdau des PCR-Fragments mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *BamHI* wurde das erhaltene 4903 bp umfassende Fragment in einen analog geschnittenen pQE70-Vektor ligiert, wodurch das Plasmid p[A-PCP-C-A-PCP]_{srfB2-3} erhalten wurde. Das für die A- und PCP-Domäne der Tyrocidin-Synthetase A (TycA) codierende Genfragment [A-PCP]_{tycA} wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5'(BstEII)TycA 5'- ATT **TGG TCA CCA** ATC TCA TCG ACA A -3' und 3'TycA(BamHI) 5'- ATA **GGA TCC** TGT ATT CGT AAA GTT TTT C -3' aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen *BstEII* und *BamHI* verdaut. Das resultierende 1888 bp DNA-Fragment wurde in das analog geschnittene Plasmid p[A-PCP-C-A-PCP]_{srfB2-3} ligiert, wodurch das Plasmid p[A-PCP-C]_{srfB2}-[A-PCP]_{tycB2} gebildet wurde. Dieses Plasmid wurde mit *Clal* und *BglII* geschnitten, um die 3'-terminale *tycA* DNA, die für das TycA-PCP codiert, zu entfernen. Das geschnittene Plasmid wurde mit dem 897 bp [PCP-Te]_{srfC}-DNA-Fragment ligiert, das durch Amplifikation aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 mit den Oligonukleotiden 5'TesrfC1(*Clal*) 5'- ATA **ATC GAT** AAT CGC ACA AAT ATG GTC -3' und 3'int.srf-Te(*BglII*) 5'- ATA **AGA TCT** AAC CGT TAC GGT TTG TGT -3' und anschließend Restriktionsverdau mit *Clal* und *BglII* erhalten wurde. Bei dem resultierenden Plasmid p[A-PCP-C]_{srfB2-3}-[A]_{tycA}-[PCP-Te]_{srfC} handelt es sich um das pAspPhe-1, welches das für die Asp-Phe-Synthetase Asp-Phe-I codierende, rekombinante Gen enthält.

pAspPhe-3: Dieses Plasmid basiert auf dem pQE60-Vektor und ist ein Derivat des Plasmids p[A]_{bacA1}-[PCP-C-A]_{tycB2}-[PCP-Te]_{tycC6} [Doekel & Marahiel, 2000]. Das für die Domänen A-PCP des zweiten Moduls der Surfactin-Synthetase B (SrfB2) codierende DNA-Fragment [A-PCP]_{srfB2} wurde mit den Oligonukleotiden 5'srfB2-A

(NcoI) 5'- TAA **CCA TGG** TGC TTT CAT CTG CAG AAA C -3' und 3'srfB2-T (EcoRV) 5'- TAT **GAT ATC** CTC CAT ATA AGC CGC -3' aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert. Nach der Modifikation mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *EcoRV* wurde das 1816 bp [A-PCP]_{srfB2}-Fragment in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid p[A]_{bacA1}-[PCP-C-A]_{tycB2}-[PCP-Te]_{tycC6} ligiert. Das erhaltene Plasmid pAspPhe-3 trägt das Genfragment [A-PCP]_{srfB2}-[C-A]_{tycB2}-[PCP-Te]_{tycC6}, welches für die Hybridsynthetase Asp-Phe-III codiert.

pAspPhe-2: Das Plasmid pAspPhe-2 ist ein Derivat des Plasmids pAspPhe-3. Das für die Domänen PCP-Te der Surfactin-Synthetase C (SrfC) codierende DNA-Fragment [PCP-Te]_{srfC} wurde mit den Oligonukleotiden 5'srfC-T (*HpaI*) 5'- TAT **GTT AAC** TGG ATT GGA CCG CGG AAC -3' und 3'srfC-Te (*BamHI*) 5'- TAT **GGA TCC** TGA AAC CGT TAC GGT TTG TG -3' aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *HpaI* und *BamHI* modifiziert. Durch Ligation des erhaltenen 931 bp [PCP-Te]_{srfC}-Fragments mit dem identisch geschnittenen pAspPhe-3 wurde das Plasmid pAspPhe-2 (p[A-PCP]_{srfB2}-[C-A]_{tycB2}-[PCP-Te]_{srfC}) konstruiert, welches für die Produktion des Enzyms Asp-Phe-II eingesetzt wurde.

pAspPhe-4: Analog der Konstruktion des pAspPhe-2 wurde pAspPhe-4 kloniert. Aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 wurde mit den Oligonukleotiden 5'tycC6-T (*HpaI*) 5'- TAT **GTT AAC** GAA TAC GTG GCC CCG AG -3' und 3'tycC6-T (*BamHI*) 5'- TAT **GGA TCC** GAA ATC GGC CAC CTT TTC G -3' das [PCP]_{tycC6}-DNA-Fragment amplifiziert und anschließend mit *HpaI* und *BamHI* verdaut. Das erhaltene 226 bp Fragment wurde in das identisch geschnittene Plasmid pAspPhe-3 ligiert. Das resultierende Plasmid pAspPhe-4 (p[A-PCP]_{srfB2}-[C-A]_{tycB2}-[PCP]_{tycC6}) wurde für die Produktion der Synthetase Asp-Phe-IV eingesetzt.

pAspPhe-5: Um das Plasmid pAspPhe-5 zu konstruieren wurde zunächst das [A-PCP]_{srfB2}-Fragment des *srfB2*-Gens aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 mit den Oligonukleotiden 5'srfB2-A (*NcoI*) 5'- TAA **CCA TGG** TGC TTT CAT CTG CAG AAA C -3' und 3'srfB2-T (*BamHI*) 5'- TAT **GGA TCC** CTC CAT ATA AGC CGC -3' amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BamHI* verdaut und

das erhaltene 1814 bp Fragment in einen identisch geschnittenen pQE60 ligiert. Das resultierende Plasmid p[A-PCP]_{srfB2} wurde durch Verdau mit *Bam*HI linearisiert. Aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 wurde mit den Oligonukleotiden 5'tycB2-C (*Bgl*III) 5'- ATT **AGA TCT** GAG GAA AGC GCG TAT CTC G -3' und 3'tycB2-T (*Bgl*III) 5'- AAT **AGA TCT** TTC GAT CAA GCG GGC CAA G -3' das Genfragment [C-A-PCP]_{tycB2} amplifiziert. Nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*II wurde das 3105 bp Fragment in den linearisierten p[A-PCP]_{srfB2} ligiert, wodurch p[A-PCP]_{srfB2}-[C-A-PCP]_{tycB2} gebildet wurde. Die Orientierung des [C-A-PCP]_{tycB2}-Inserts wurde nach dieser ungerichteten Klonierung durch Restriktionsverdaue analysiert. Im letzten Klonierungsschritt wurde das für die Tyc-Te-Domäne codierende Gen [Te]_{tycC6} unter Verwendung der Primer 5'tycC6-Te (*Bgl*III) 5'- TAA **AGA TCT** GCC ATT TTG TTA AAT CAG -3' und 3'tycC6-Te (*Bam*HI) 5'- TAT **GGA TCC** TTT CAG GAT GAA CAG TTC TTG -3' aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert und mit *Bgl*II und *Bam*HI terminal modifiziert. Das Plasmid pAspPhe-5 (p[A-PCP]_{srfB2}-[C-A-PCP]_{tycB2}-[Te]_{tycC6}) wurde erhalten, indem das 732 bp-Te-Fragment in das mit *Bgl*II linearisierte p[A-PCP]_{srfB2}-[C-A-PCP]_{tycB2} ligiert wurde. Das Plasmid pAspPhe-5 wurde für die Produktion des Hybridenzym *Asp-Phe-V* verwendet.

pAspPhe-6: Die Konstruktion dieses Plasmids basiert auf dem Plasmid p[A-PCP-C-A-PCP]_{srfB2-3} (siehe Konstruktion pAspPhe-1). Das [A-PCP]_{tycB2}-DNA-Fragment wurde durch Amplifikation aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 mit den Oligonukleotiden 5'tycB2-A (*Bst*EII) 5'- ATA **GGT CAC CGC** GCA TGA GAA GCA G -3' und 3'tycB2-T (*Bam*HI) 5'- AAT **GGA TCC** TTC GAT CAA GCG GGC C -3' und anschließend Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bst*EII und *Bam*HI erhalten. p[A-PCP-C-A-PCP]_{srfB2-3} wurde mit *Bst*EII und *Bam*HI geschnitten und mit dem 1789 bp Fragment [A-PCP]_{tycB2} zum Plasmid p[A-PCP-C]_{srfB2-3}-[A-PCP]_{tycB2} ligiert. Das [Te]_{tycC6}-Gen-Fragment wurde aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 mit den Oligonukleotiden 5'tycC6-Te (*Bgl*III) 5'- TAA **AGA TCT** GCC ATT TTG TTA AAT CAG -3' und 3'tycC6-Te (*Bam*HI) 5'- TAT **GGA TCC** TTT CAG GAT GAA CAG TTC TTG -3' amplifiziert und mit *Bgl*II und *Bam*HI terminal modifiziert. Das erhaltenen 732 bp Fragment wurde in das mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnittene Plasmid p[A-PCP-C]_{srfB2-3}-[A-PCP]_{tycB2} ligiert. So konnte das Plasmid pAspPhe-6 (p[A-PCP-C]_{srfB2-3}-[A-PCP]_{tycB2}-[Te]_{tycC6})

konstruiert werden, welches das für die Asp-Phe-Synthetase Asp-Phe-**VI** codierende, rekombinante Gen trägt

4.1.1.2 Cy-Projekt: Plasmide für die Hybridsynthetasen

p[A-PCP-Cy-A-PCP]_{bacA1-2}: Das Ausgangskonstrukt der Plasmidkonstruktion zur Untersuchung der Cy-Domäne war das Plasmid p[A-PCP-Cy-A-PCP]_{bacA1-2}, ein Derivat des pQE60. Das *bacA1-2*-Genfragment wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5'*bacA1-A* (NcoI) 5'- TAT **ACC ATG GTT** GCT AAA CAT TCA TTA G -3' und 3'*bacA2-T* (BglII) 5'- TTA **AGA TCT** GTT TTT CAA ATA GTG GTC C -3' aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* ATCC 10716 amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BglII* modifiziert. Das resultierende 4956 bp Fragment wurde in einen pQE60-Vektor, der mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde, ligiert.

pbacA1-2-tycTe: Dieses Plasmid ist ein Derivat des Plasmids p[A-PCP-Cy-A-PCP]_{bacA1-2}. Das für die Te-Domäne der Tyrocidin-Synthetase C (TycC) codierende Genfragment [Te]_{tycC6} wurde mit den Oligonukleotiden 5'*tycTe* (BglII) 5'- ATA **AGA TCT** CAT AAG CGC TTT GAG AGC AG -3' und 3'*tycTe* (BamHI) 5'- TAT **GGA TCC** TTT CAG GAT GAA CAG TTC TTG -3' aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert. Nach Restriktionsverdau mit *BglII* und *BamHI* wurde das 756 bp Amplifikat in das mit *BglII* linearisierte Plasmid p[A-PCP-Cy-A-PCP]_{bacA1-2} ligiert. Das erhaltene Plasmid pbacA1-2-tycTe (p[A-PCP-Cy-A-PCP]_{bacA1-2}-[Te]_{tycC6}) wurde für die Produktion des dimodularen Hybridenzym BacA1-2-Te_{Tyc} verwendet.

pbacA1-2-srfTe: Aus dem Plasmid pTe_{srf} [Kohli et al., 2001] wurde mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *XbaI* ein 1750 bp Fragment herausgeschnitten, welches in das mit den gleichen Enzymen verdaute Plasmid p[A-PCP-Cy-A-PCP]_{bacA1-2} ligiert wurde. Das resultierende Plasmid pbacA1-2-srfTe (p[A-PCP-Cy-A-PCP]_{bacA1-2}-[Te]_{srfC}) enthält das für die Synthetase BacA1-2-Te_{Srf} codierende Gen.

pbacA1-2-tyrTe: Aus dem Plasmid pTe_{tyr} [Schwarzer et al., 2001] wurde mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *XbaI* ein 1744 bp großes Fragment herausgeschnitten. Dies wurde in das mit den gleichen Enzymen verdaute Plasmid p[A-PCP-

Cy-A-PCP]_{bacA1-2} ligiert. So wurde das Plasmid *pbacA1-2-tyeTe* (p[A-PCP-Cy-A-PCP]_{bacA1-2}-[Te]_{tye}) für die Überproduktion des Hybridenzym BacA1-2-Te_{tye} erhalten.

pbac-mbt-1: Die Konstruktion der Plasmide für die Produktion der Cy-Domänen-Hybridsynthetasen erfolgte auf Basis des pQE60-Vektors. Das [A-PCP]_{bacA1}-Genfragment wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5'*bacA1*-A (NcoI) 5'- TAT **ACC ATG GTT** GCT AAA CAT TCA TTA G -3' und 3'*bacA1*-T (BamHI) 5'- TAT **GGA TCC** TTC GAT AAA AGC GCT CAA TTC -3' aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* ATCC 10716 amplifiziert. Nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BamHI* wurde das 1829 bp Fragment in einen identisch geschnittenen pQE60-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid p[A-PCP]_{bacA1} wurde dann mit *BglII* und *BamHI* linearisiert und mit dem 3165 bp Genfragment [Cy-A-PCP]_{mbtB} ligiert. Dieses [Cy-A-PCP]_{mbtB}-Fragment wurde durch Amplifikation aus dem Plasmid pET28-mbtB (Louis Quadri) mit den Oligonukleotiden 5'*mbtB*-Cy (BglII) 5'- ATA **AGA TCT** ACC GGC GTC GCG CCC AC -3' und 3'*mbtB*-T (BglII) 5'- AAT **AGA TCT** GGT GAG CAA CTG GGC CAA CG -3' und anschließendem Verdau mit *BglII* erhalten. Die Richtigkeit der Orientierung des Inserts im Plasmid p[A-PCP]_{bacA1}-[Cy-A-PCP]_{mbtB} nach dieser ungerichteten Ligation wurde durch Restriktionsanalysen überprüft. Die Fusion des Thioesterase codierenden Gens [Te]_{tycC6} erfolgt, indem aus dem Plasmid *pbacA1-2-tycTe* mittels der Restriktionsendonukleasen *BglII* und *XbaI* ein 1768 bp umfassendes DNA-Fragment, welches das [Te]_{tycC6}-Gen trägt, herausgeschnitten wurde. Dieses DNA-Fragment wurde in das mit *BglII* und *XbaI* modifizierte Plasmid p[A-PCP]_{bacA1}-[Cy-A-PCP]_{mbtB} ligiert. Das *pbac-mbt-1*-Plasmid (p[A-PCP]_{bacA1}-[Cy-A-PCP]_{mbtB}-[Te]_{tycC6}) wurde für die Produktion der Hybridsynthetase Bac-Mbt-I genutzt.

pbac-mbt-2: Das [A-PCP-Cy]_{bacA1-2}-Genfragment wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5'*bacA1*-A (NcoI) 5'- TAT **ACC ATG GTT** GCT AAA CAT TCA TTA G -3' und 3'*bacA2*-Cy (BamHI) 5'- ATA **GGA TCC** GGC TTT CTG GAT GAC AG -3' aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* ATCC 10716 amplifiziert und durch die Restriktionsenzyme *NcoI* und *BamHI* terminal modifiziert. Durch Ligation des erhaltenen 3170 bp Fragment in einen analog geschnittenen pQE60-Vektor wurde das Plasmid p[A-PCP-Cy]_{bacA1-2} erhalten. Das [A-PCP]_{mbtB}-DNA-Fragment wurde aus dem Plasmid pET28-mbtB mit den Oligonukleotiden 5'*mbtB*-A (BglII) 5'- AAT **AGA**

TCT GGG GAC GAC GCC TGG G -3' und 3'mbtB-T (BglII) 5'- AAT **AGA TCT** GGT GAG CAA CTG GGC CAA CG -3' amplifiziert und mit *BglII* terminal modifiziert. Das resultierende 1848 bp Fragment wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *BglII* geschnittene p[A-PCP-Cy]_{bacA1-2}-Plasmid ligiert, wodurch das Plasmid p[A-PCP-Cy]_{bacA1-2}-[A-PCP]_{mbtB} gebildet wurde. Die Fusion des [Te]_{tycC6}-Gens erfolgte über das 1768 bp Fragment aus *pbacA1-2-tycTe*, wie es für das Plasmid *pbac-mbt-1* beschrieben wurde. Das resultierende Plasmid *pbac-mbt-2* (p[A-PCP-Cy]_{bacA1-s}-[A-PCP]_{mbtB}-[Te]_{tycC6}) enthält das für die Hybridsynthetase Bac-Mbt-II codierende, rekombinante Gen.

pbac-mta-1: Ausgangskonstrukt des *pbac-mta-1* ist das Plasmid p[A-PCP]_{bacA1} (siehe Konstruktion *pbac-mbt-1*). Das [Cy-A(Ox)-PCP]_{mtaD}-Genfragment wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'mtaD-Cy (BglII) 5'- ATT **AGA TCT** CGC TCC GCG AAT CTT CAG -3' und 3'mtaD-T (BglII) 5'- ATA **AGA TCT** GTG GAT GAA CTC CGC CAG -3' aus dem Cosmid E25 [Silakowski et al., 1999] amplifiziert und anschließend mit *BglII* verdaut. Durch Ligation des 4002 bp Amplifikats in das mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *Bam*HI geschnittene Plasmid p[A-PCP]_{bacA1} wurde das Plasmid p[A-PCP]_{bacA1}-[Cy-A(Ox)-PCP]_{mtaD} erhalten. Durch Fusion des [Te]_{tycC6}-Genfragments wurde, wie zuvor für *pbac-mbt-1* beschrieben das Plasmid *pbac-mta-1* (p[A-PCP]_{bacA1}-[Cy-A(Ox)-PCP]_{mtaD}-[Te]_{tycC6}) erhalten, welches für die Überproduktion der Synthetase Bac-Mta-I genutzt wurde.

pbac-mta-2: Mit Hilfe der Oligonukleotide 5'mtaD-A (BglII) 5'- TAT **AGA TCT** GAT GCC TCG GCG TGG G -3' und 3'mtaD-T (BglII) 5'- ATA **AGA TCT** GTG GAT GAA CTC CGC CAG -3' wurde das [A(Ox)-PCP]_{mtaD}-Genfragment aus dem Cosmid E25 amplifiziert. Das 2679 bp umfassende Amplifikat wurde mit der Restriktionsendonuklease *BglII* modifiziert und in das mit *BglII* und *Bam*HI geschnittene Plasmid p[A-PCP]_{bacA1} ligiert. Das resultierende Plasmid p[A-PCP-Cy]_{bacA1}-[A(Ox)-PCP]_{mtaD} wurde, wie bei der Konstruktion des Plasmids *pbac-mta-1* beschrieben, um das [Te]_{tycC6}-Genfragment erweitert. Das so erhaltene Plasmid *pbac-mta-2* (p[A-PCP-Cy]_{bacA1}-[A(Ox)-PCP]_{mtaD}-[Te]_{tycC6}) diente zur Produktion der Hybridsynthetase Bac-Mta-II.

4.1.1.2 Cy-Projekt: Plasmide für die Mutationsanalyse

Alle Plasmide, die für die Mutationsanalyse der Cy-Domäne hergestellt wurden, basieren auf dem Plasmid *pbacA1-2-tycTe*. Die Einführung der Mutationen erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese mit dem „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (*Stratagene*, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers. Nachfolgend sind die aus der Mutagenese resultierenden Plasmide und die jeweils verwendeten Oligonukleotide aufgeführt (mutierte Basen sind kursiv, die betroffenen Codons sind unterstrichen).

pCy-T875A:

CyT875A 5'-CGG CAT CAT CAT CTC GCA CCG ACT TCC GTC CTT TG-3'

CyT875Arev 5'-CAA AGG ACG GAA GTC GGTGCG AGA TGA TGA TGC CG-3'

pCy-N900A:

CyN900A 5'-CGG CAA AAT CAT TTT GCT ATC GCG TTA ACC GTA TTT AAC
AGA ATC CCG-3'

CyN900Arev 5'-CGG GAT TCT GTT AAA TAC GGT TAA CGC GAT AGC AAA ATG
ATT TTG CCG-3'

pCy-R906A:

CyR906A 5'-GCT ATC AAT TTA ACC GTA TTT AAC GCG ATC CCG TTT CAT
CCG GAT GTC AAG-3'

CyR906Arev 5'-CTT GAC ATC CGG ATG AAA CGG GAT CGC GTT AAA TAC GGT
TAA ATT GAT AGC-3'

pCy-D919A:

CyD919A 5'-GGA TGT CAA GAA CAT GAT CGG AGC CTT TAC CTC TTT AAT
GCT GCT GG-3'

CyD919Arev 5'-CCA GCA GCA TTA AAG AGG TAA AGG CTC CGA TCA TGT TCT
TGA CAT CC-3'

pCy-S984A:

CyS984A 5'-GCC GAT CGT ATT CAC AGC TGT GCT GAT TGA AAA TCC C-3'

CyS984Arev 5'-GGG ATT TTC ACT CAG CAC AGC TGT GAA TAC GAT CGG C-3'

4.1.2 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung zur Überprüfung der konstruierten Plasmide wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt [Sanger et al., 1977]. Bei diesem Verfahren werden fluoreszenzmarkierte ddNTPs in DNA-Abbruchfragmente eingebaut. Die verschiedenen Fluoreszenzmarker für die vier Basen können dann detektiert und damit die Sequenz analysiert werden. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des „ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (ABI, Forster City, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Analyse der Sequenzierung erfolgte mit dem „ABI Prism 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

4.2 Proteinchemische Methoden

Auch in der Proteinchemie wurden Methoden angewendet, die bereits beschrieben wurden und deswegen hier nicht weiter erläutert werden. Dazu gehören die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970] und die Coomassie-Färbung der SDS-Gele [Bennett & Scott, 1971].

4.2.1 Genexpression im pQE-Vektor-System

Die Expression der rekombinanten, in pQE60- oder pQE70-Vektoren integrierten Gene erfolgte in den Expressionsstämmen *E. coli* M15-pREP4 oder *E. coli* BL21(λ DE3)-pREP4[*gsp*]. Diese Expressionsstämme wurden mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert. Durch den IPTG-induzierbaren T5-Promotor der pQE-Vektoren ist eine kontrollierte Expression möglich. Dazu wurden 300 mL vorgewärmtes LB- oder 2xYT-Medium (Amp^{100} , Kan^{25}) mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Expressionsstamms inokuliert. Die Kulturen zur Produktion der Asp-Phe-Synthetasen wurden bei 37°C und 250 Upm bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 bis 0,7 inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 mM IPTG wurde die Genexpression induziert und die Zellen weitere 1,5 h bei 30°C inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

Die Überproduktion der Cy-Domänen-Konstrukte erfolgte analog, allerdings wurden, um die Löslichkeit der rekombinanten Proteine zu erhöhen, die Zellen bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,7 gezogen, bevor die Induktion mit IPTG erfolgte. Nach einer Inkubation von weiteren 3 h bei 25°C wurden die Zellen durch

Zentrifugation (5000 Upm, 4°C, 10 min) geerntet. Die Zellpellets wurden entweder in Aufschlusspuffer aufgenommen und direkt verarbeitet (s.u.) oder bei –20°C gelagert.

4.2.2 Zellaufschluss

Vor dem Aufschluss der Zellen wurden die Zellpellets in 10 mL des Aufschlusspuffers (HEPES A: 50 mM HEPES, 300mM NaCl) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte dann unter Kühlung bei 4°C durch dreimaliges Durchlaufen von Kompressions-Dekompressionszyklen an der „French Press-Zelle“ (*SLM Aminco*, Waldbronn). Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (17500 Upm, 4°C, 30 min) vom Rohzellextrakt getrennt. Der klare Überstand dieser Zentrifugation wurde dann für die Affinitätschromatographie verwendet.

4.2.3 Proteinreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Bedingt durch die Klonierungsstrategien besitzen alle in dieser Arbeit beschriebenen rekombinanten Proteine einen C-terminalen His₆-tag, der die einfache und effiziente Reinigung durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Ni²⁺-IMAC) ermöglicht. An einer speziellen Säulenmatrix ist Nitrilotriacetat (NTA) gebunden, welches Ni²⁺-Ionen an vier seiner sechs Koordinationsstellen komplexiert und damit an der Säulenmatrix immobilisiert. Die chelatbildenden Histidinreste des His₆-tags können die freien Koordinationsstellen der Ni²⁺-Ionen besetzen, sodass die Proteine an der Säulenmatrix gebunden werden [Porath et al., 1975]. Gebundene Proteine können durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol von der Säule eluiert werden. Auf diese Weise können die rekombinanten, mit dem His₆-tag versehenen Proteine aus dem Rohzellextrakt abgetrennt werden.

Die Proteinreinigung mittels Ni²⁺-IMAC erfolgte unter Verwendung von Ni²⁺-NTA Agarose (*Qiagen*, Hilden). Die Reinigung wurde an einer FPLC-Anlage (*Amersham Biosciences*, Freiburg) bei 4°C durchgeführt. Der Rohzellextrakt wurde mit einer Flussrate von 0,75 - 1 mL/min auf das Säulenmaterial (1 mL) aufgetragen. Der Waschvorgang sowie die nachfolgende Elution wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm in einer Durchflussszelle verfolgt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines Gradienten von HEPES A zum imidazolhaltigen HEPES B bei einer Flussrate von 0,75 - 1,0 mL/min. Die Fraktionen wurden in

2 mL-Volumen aufgefangen. Nach Bradford-Test [Bradford, 1976] und SDS-PAGE-Analyse wurden die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten vereinigt und dialysiert. Die Dialyse diente zum einen der Entfernung des Imidazols, das in den nachfolgenden Untersuchungen störend sein kann, zum anderen der Umpufferung der rekombinanten Enzyme mit dem für die biochemische Analyse notwendigen Assaypuffer.

FPLC-Puffer:

| | | |
|----------------|----------|---------------|
| HEPES A | HEPES | 50 mM, pH 8.0 |
| | NaCl | 300 mM |
| HEPES B | HEPES | 50 mM, pH 8.0 |
| | NaCl | 300 mM |
| | Imidazol | 250 mM |

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde mittels Bradford-Test bei einer Absorption von 595 nm [Bradford, 1976] oder bei einer Absorption bei 280 nm unter Berücksichtigung des berechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt.

4.2.4 Reinigung der hybriden Asp-Phe-Synthetasen

Alle rekombinanten Asp-Phe-Proteine wurden überproduziert und gereinigt wie in den Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.3 beschrieben. Vor der Reinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie wurde der Rohzelleextrakt mit HEPES B versetzt (Endkonzentration 1% (v/v)). Die Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säule wurde äquilibriert mit 1% (v/v) HEPES B, um unspezifischer Bindung von Proteinen ohne His₆-tag vorzubeugen. Bei einer Flussrate von 0,75 mL/min wurde der Rohzelleextrakt aufgetragen. Die Elution erfolgte bei ebenfalls 0,75 mL/min mit dem folgenden Gradienten:

| | | |
|----------------------|--------|--------------|
| FPLC-Gradient | 0 min | 1% HEPES B |
| | 10 min | 1% HEPES B |
| | 30 min | 30% HEPES B |
| | 35 min | 100% HEPES B |
| | 45 min | 100% HEPES B |
| | 50 min | 0% HEPES B |

Die Dialyse gegen den Assaypuffer erfolgte unter Verwendung von „Hi-trap-Desalting Columns“ (Amersham Biosciences Europe, Freiburg) nach Angaben des Herstellers bei einer Flussrate von 5 mL/min.

| | | |
|--------------------|-------------------|---------------|
| Assaypuffer | HEPES | 50 mM, pH 8.0 |
| | MgCl ₂ | 20 mM |
| | DTT | 2 mM |
| | | |

4.2.5 Reinigung der Cy-Domänen-Synthetasen

Alle rekombinanten Proteine zur Untersuchung der Cy-Domäne wurden überproduziert und gereinigt wie in den Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.3 beschrieben. Dem Rohzelleextrakt wurde vor der Reinigung durch Ni²⁺-IMAC HEPES B zugesetzt (Endkonzentration 2% (v/v)). Die Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule wurde mit 2% (v/v) HEPES B äquiliert. Bei einer Flussrate von 1,0 mL/min wurde der Rohzelleextrakt aufgetragen. Die Elution erfolgte bei ebenfalls 1,0 mL/min mit dem folgenden Gradienten:

| | | |
|----------------------|--------|--------------|
| FPLC-Gradient | 0 min | 2% HEPES B |
| | 10 min | 2% HEPES B |
| | 40 min | 30% HEPES B |
| | 45 min | 100% HEPES B |
| | 55 min | 100% HEPES B |
| | 60 min | 0% HEPES B |

Die Dialyse gegen den Assaypuffer erfolgte unter Verwendung von „Hi-trap-Desalting Columns“ (*Amersham Biosciences Europe*, Freiburg) bei einer Flussrate von 5 mL/min.

| | | |
|--------------------|-------|---------------|
| Assaypuffer | HEPES | 50 mM, pH 8.0 |
| | NaCl | 100 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| | DTT | 2 mM |

Die Hybridenzyme Bac-Mbt-I, Bac-Mbt-II, Bac-Mta-I und Bac-Mta-II wurden aufgrund ihrer geringen Konzentration nach der Umpufferung zusätzlich mittels „Amicon Ultra 100,000 MWCO“ (*Millipore*, Schwalbach) ankonzentriert.

4.2.6 Biochemische Charakterisierung – Aktivitätstests

4.2.6.1 ATP-PP_i-Austauschreaktion

Der erste Schritt in der *in vitro* Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter Peptidsynthetasen ist die ATP-PP_i-Austauschreaktion, die zur Bestimmung der A-Domänen-Aktivität verwendet wird [Lee & Lipmann, 1975]. Die A-Domänen aktivieren die Substrataminosäuren als Aminoacyladenylat. Dies geschieht in einer reversiblen Reaktion unter ATP-Verbrauch und Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i). In der Rückreaktion kann zugesetztes, radioaktiv markiertes [³²P]-PP_i in ATP inkorporiert werden, welches dann mit Aktivkohle selektiv aus dem Reaktionsansatz extrahiert werden kann. Da die Inkorporation des [³²P]-PP_i ins ATP nur möglich ist, wenn zuvor durch die A-Domäne das Aminoacyladenylat gebildet wurde, dient die Menge an entstandenem [³²P]-ATP als Maß für die Aktivierung der eingesetzten Substrataminosäuren.

Bei der ATP-PP_i-Austauschreaktion wurde das zu analysierende Enzym in einem 100 µL-Ansatz mit Aminosäure, ATP, PP_i, [³²P]-PP_i und MgCl₂ im Assaypuffer 15 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrollreaktion wurden identische Ansätze ohne Aminosäure eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µL Terminationsmix abgestoppt. Durch Zentrifugation (13000 Upm, 2 min) wurde die Aktivkohle mit dem gebundenen ATP abgetrennt. Das Pellet wurde durch zweimaliges Resuspendieren mit 500 µL Wasser und Zentrifugation gewaschen, anschließend in 500 µL Wasser aufgenommen und in ein 4 mL-Polypropylenröhrchen mit 3 mL Szintillationsflüssigkeit (Rotizint Eco Plus, Roth, Karlsruhe) überführt. Die Zählraten wurden dann durch Flüssig-Szintillations-Zählung (LCS) bestimmt.

Reaktionsansatz

| | | |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------|
| ATP-PP_i-Austausch | Enzym | 200 nM |
| | Aminosäure | 1 mM |
| | ATP | 4 mM |
| | Na ₄ P ₂ O ₇ | 0,4 mM |
| | MgCl ₂ | 10 mM |
| | [³² P]-Na ₄ P ₂ O ₇ | 0,15 µCi |
| | Assaypuffer | add. 100 µL |

Terminationsmix

| | |
|-----------------------------------------------|------------|
| Na ₄ P ₂ O ₇ | 100 mM |
| HClO ₄ | 500 mM |
| Aktivkohle (Norit A) | 1,2% (w/v) |

4.2.6.2 Beladungsreaktion

Durch die A-Domäne aktivierte Aminosäuren werden auf den 4'-PP-Cofaktor der angrenzenden PCP-Domäne gebunden. In der Beladungs- oder Thiolierungsreaktion wird die Funktionalität der PCP-Domäne untersucht. Damit lassen sich Aussagen über die Domänenkommunikation zwischen A- und PCP-Domäne treffen sowie die Modifikation des PCP mit dem 4'-PP-Cofaktor analysieren. Durch Inkubation des Enzyms mit radioaktiv markierten [^3H]- oder [^{14}C]-Aminosäuren können diese kovalent am Enzym gebunden werden. Nach Präzipitation der Enzyme wurde die enzymgebundene Radioaktivität analysiert.

Das zu analysierende Enzym wurde mit den entsprechenden markierten Substrataminosäuren in Gegenwart von ATP und MgCl_2 bei 37°C für 20 min inkubiert. Danach wurde der Reaktion 15 μL BSA-Lösung (25 mg/mL) zugegeben. Durch Zugabe von 800 μL TCA-Lösung (10% w/v, 4°C) wurde die Reaktion anschließend gestoppt. Die kovalent gebundenen, markierten Aminosäuren wurden dabei zusammen mit den Proteinen präzipitiert. Nach Inkubation auf Eis (30 min) wurden die Proteine durch Zentrifugation (13000 Upm, 4°C , 30 min) pelletiert, anschließend mit 800 μL TCA-Lösung (10% w/v, 4°C) gewaschen und nochmals zentrifugiert (13000 Upm, 4°C , 5 min). Danach wurden die Proteine in 400 μL Ameisensäure gelöst und in 4 mL-Polypropylenröhrchen mit 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit (Rotizint Eco Plus, Roth, Karlsruhe) überführt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels LSC.

| | | |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------|
| Beladungsreaktion | Enzym | 500 nM |
| | [^3H] od. [^{14}C]-Aminosäure | 1-2 mM |
| | ATP | 4 mM |
| | MgCl_2 | 10 mM |
| | Assaypuffer | add. 100 μL |

4.2.7 Modifikation mit dem 4'-PP-Cofaktor *in vitro*

Die Überproduktion rekombinanter NRPS in *E. coli* M15-Zellen erfordert eine nachträgliche *in vitro*-Modifikation mit dem 4'-PP-Cofaktor, da eine Coexpression des für die PPTase Gsp codierenden Gens *gsp* in diesen Zellen nicht möglich ist. Außerdem kann durch nachträgliche Modifikation *in vitro* das Maß der *in vivo*-Modifikation ermittelt werden. Für die *in vitro*-Modifikation wurde die PPTase Sfp aus *B. subtilis* verwendet [Mofid et al., 1999]. Die zu untersuchenden Hybridsynthetasen

wurden mit ATP, CoenzymA und Sfp bei 37°C 20 min inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte dann die Analyse der Beladungsreaktion (vgl. Kapitel 4.2.6.2).

| | | |
|-------------------------------------|-------------------|-------------|
| <i>in vitro</i>-Modifikation | Enzym | 500 nM |
| | Sfp | 10 nM |
| | CoA | 100 µM |
| | ATP | 4 mM |
| | MgCl ₂ | 10 mM |
| | Assaypuffer | add. 100 µL |

4.3 Produktanalytik

4.3.1 Dünnschichtchromatographie

Die Produktbildungsaktivität der BacA1-2-Te-Enzyme wurde zunächst durch Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. Dazu wurden die Enzyme mit [¹⁴C]-Isoleucin, Cystein und ATP bei 37°C für bestimmte Zeitintervalle in einem 100 µL-Ansatz mit Assaypuffer (vgl. 4.2.5) inkubiert, um die Bildung [¹⁴C]-markierter Produkte zu erreichen.

| | | |
|-------------------|------------------------------|-------------|
| DC-Analyse | Enzym | 500 nM |
| | [¹⁴ C]-Isoleucin | 2 mM |
| | Cystein | 1 mM |
| | ATP | 4 mM |
| | MgCl ₂ | 10 mM |
| | Assaypuffer | add. 100 µL |

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL eines n-Butanol-Chloroform-Gemischs (4:1 v/v) gestoppt. Nach kurzem Vortexieren wurden die Proben in der Speed-Vac bis zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden danach in 30 µL Methanol aufgenommen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (13000 Upm, 10 min) abgetrennt. 3 µL des klaren Überstands wurden auf Silikagelplatten (Silika gel 60 F254, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel für die DC-Analyse diente ein Gemisch aus n-Butanol, Essigsäure, Essigsäureethylester und Wasser (1:1:1:1, v/v). Die Analyse der DC erfolgte mittels Autoradiographie durch 24 – 48 stündiges Auflegen eines Biomax-Röntgen-Films (Kodak, Rochester, USA).

4.3.2 HPLC-Analytik

Die Produktanalyse und –identifizierung erfolgte mittels HPLC/MS (Series 1100 HPLC-System, *Agilent*, Waldbronn). Als Säule wurde eine C₁₈-Reversed-Phase Säule „C250/3 Nucleosil 120-3 C₁₈“ (Porengröße 120 Å, Partikelgröße 3 µm, *Macherey – Nagel*, Düren) verwendet. Die Massenanalyse erfolgte mit einer ESI-MS-Anlage mit single-Quadrupol Massendetektor.

4.3.2.1 HPLC/MS-Analyse – Asp-Phe-Konstrukte

Die Produktanalyse der Asp-Phe-Synthetasen erfolgte durch Inkubation der Hybridenzyme bei 37°C mit ATP und beiden Substrataminosäuren in Assaypuffer (vgl. 4.2.4). Nach bestimmten Zeitintervallen wurden die Reaktionen durch Zugabe von 100 µL n-Butanol abgestoppt. Durch Zentrifugation (13000 Upm, 10 min) wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der klare Überstand wurde an der Speed-Vac bis zur Trockne eingedampft und anschließend in 100 µL 10% Methanol resuspendiert.

| | | |
|------------------------|--------------|-------------|
| HPLC/MS-Analyse | Enzym | 500 nM |
| | Aspartat | 1 mM |
| | Phenylalanin | 1 mM |
| | ATP | 2 mM |
| | Assaypuffer | add. 100 µL |

Jeweils 10 µL der in 10 % Methanol aufgenommenen Proben wurden auf die HPLC-Säule injiziert. Als Laufmittel dienten Wasser/0,1% TFA (v/v; Puffer A) und Methanol/0,1% TFA (v/v; Puffer B). Die chromatographische Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,3 mL/min mit dem folgenden Gradienten:

| | | |
|----------------------|--------|--------------|
| HPLC-Gradient | 0 min | 10% Puffer B |
| | 25 min | 60% Puffer B |
| | 30 min | 95% Puffer B |
| | 34 min | 95% Puffer B |
| | 36 min | 10% Puffer B |
| | 40 min | 10% Puffer B |

Die Massenanalyse erfolgte durch Elektrospray-Ionisierung im Positiv-Mode. Asp-Phe wurde durch Suche nach die Massen 175, 221, 235, 281, 303 und 319 m/z im *single-ion-mode* (SIM) identifiziert. Die Asp-Phe Menge wurde durch Vergleich mit Verdünnungsreihen chemischer Standards ermittelt. Das Verhältnis von α-Asp-Phe

und β -Asp-Phe wurde durch Vergleich der Integrale der HPLC/MS-Signale berechnet. Die Auswertung der HPLC/MS-Analyse erfolgte mit der Software „Chem Station“ (*Hewlett Packard*).

4.3.2.2 HPLC/MS-Analyse – Cy-Konstrukte

Für die Produktanalyse der Cy-Domänen-Konstrukte wurden die Enzyme in 1 mL Gesamtvolumen mit den Substrataminosäuren und ATP bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ L n-Butanol/Chloroform (4:1 v/v) gestoppt. Die Proben wurden an der Speed-Vac bis zur Trockne eingedampft und anschließend in 10% Methanol aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (13000 Upm, 15 min) abgetrennt.

| | | |
|------------------------|-------------|-------------------|
| HPLC/MS-Analyse | Enzym | 5 mM |
| | Isoleucin | 1 mM |
| | Cystein | 1 mM |
| | ATP | 2 mM |
| | Assaypuffer | add. 1000 μ L |

Jeweils 50 μ L der Proben wurden auf die Säule injiziert. Mit den Laufmitteln Wasser/0,1% TFA (v/v; Puffer A) und Acetonitril/0,1% TFA (v/v; Puffer B) erfolgte bei einer Flussrate von 0,3 mL/min die Trennung unter Verwendung des folgenden Gradienten:

| | | |
|----------------------|--------|--------------|
| HPLC-Gradient | 0 min | 10% Puffer B |
| | 30 min | 60% Puffer B |
| | 35 min | 95% Puffer B |
| | 40 min | 95% Puffer B |
| | 42 min | 10% Puffer B |
| | 45 min | 10% Puffer B |

Die Produkte wurden durch Absorption bei 256 nm und durch Massenanalyse durch Elektrospray-Ionisierung im Positiv-Mode im m/z-Bereich von 100 bis 500 identifiziert. Die Auswertung der HPLC/MS-Analyse erfolgte mit der Software „Chem Station“ (*Hewlett Packard*).

5 Ergebnisse: Nichtribosomale Asp-Phe-Produktion

Die nichtribosomalen Peptidsynthetasen bieten eine interessante Möglichkeit der enzymatischen Synthese kurzer Peptide und deren Derivate. Die strukturelle und katalytische Eigenständigkeit der individuellen Domänen machen die NRPS zu besonderen Systemen, um durch Reorganisation und Kombination von Modulen oder einzelnen Domänen Hybridenzyme zu konstruieren. So ist das rationale Design von artifiziellen Peptidsynthetasen möglich, die als Biosynthese-Template für neue, nichtribosomal produzierte Verbindungen dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten, unter Berücksichtigung der bekannten Möglichkeiten, hybride dimodulare NRPS für die Synthese eines speziellen Produktes entwickelt werden. Das Zielmolekül dieser

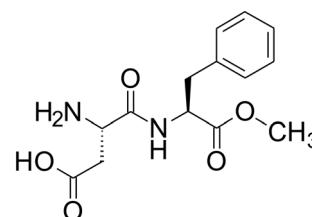


Abb. 5.1: Aspartam

Untersuchungen war das Dipeptid α -L-Aspartyl-L-Phenylalanin (Asp-Phe). Asp-Phe ist von besonderem industriellen Interesse, da es den direkten Synthese-Vorläufer des α -L-Aspartyl-L-Phenylalaninmethylesters (APM) darstellt. APM ist unter der Bezeichnung Aspartam als Zuckerersatzstoff bekannt, der jährlich im Maßstab von weit über zehntausend Tonnen hergestellt wird (siehe Abb. 5.1).

Da durch die nichtribosomale Synthese eine vollkommen enzymatisch katalysierte Produktion des APM-Vorläufers ermöglicht wird, stellt die gerichtete Peptidbiosynthese eine interessante Alternative zu den bislang bekannten Synthesewegen dar [Hill & Gelman, 1990; Irino et al., 1994]. Durch die Generierung von Peptidsynthetasen, welche Asp-Phe mit hoher Produktivität erzeugen können, wird überdies die Möglichkeit zur fermentativen Produktion des Dipeptides eröffnet. Erste Untersuchungen zur Durchführbarkeit der nichtribosomalen Asp-Phe-Synthese wurden bereits von Sascha Dökel in Zusammenarbeit mit *Holland Sweetener Company V. o. F.* (Niederlande) durchgeführt [Doekel, 2000; Doekel et al. 2000]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten weitere hybride Peptidsynthetasen entwickelt werden, um eine möglichst effiziente Asp-Phe-Produktion zu erreichen.

5.1 Nichtribosomale Asp-Phe-Synthetasen

Obwohl mittlerweile zahlreiche Biosynthesecluster entdeckt und aufgeklärt wurden, ist kein System bekannt, in dem Asp- und Phe-aktivierende Module

aufeinanderfolgend organisiert sind. Aus diesem Grund war für die nichtribosomale Synthese von Asp-Phe die artifizielle Kombination von Modulen bzw. Domänen, welche die erforderlichen Einzelaktivitäten besitzen, notwendig.

Wie im Kapitel 2.5.1 beschrieben, sind mittlerweile verschiedene Strategien zur Entwicklung aktiver hybrider NRPS-Systeme bekannt [Doekel, 2000; Doekel & Marahiel, 2000; Mootz et al., 2000; Schwarzer et al., 2001]. Es wurde gezeigt, dass Fusionen innerhalb der Linkerregionen zwischen den Domänen durchgeführt werden können, wobei die Aktivitäten der einzelnen Domänen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Fusionierte Module sind in der Lage Substrataminosäuren zu aktivieren sowie die Peptidketten-Verlängerung zu katalysieren. Des Weiteren sind Te-Domänen in der Lage, auch in kurzen hybriden Peptidsynthetasen die Produktfreisetzung sicherzustellen.

Alle bekannten Strategien der Generierung von Hybridsynthetasen wurden an verschiedenartigen Systemen entwickelt, die meist zur Synthese von Di- oder Tripeptiden befähigt waren. Zwar konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Fusionsmöglichkeiten bestehen, vergleichende Arbeiten an Synthetasen, die das gleiche Produkt bilden, fehlen aber bislang. So ermöglicht die Entwicklung verschiedener Asp-Phe-Synthetasen den direkten Vergleich der möglichen Domänenkombinationen.

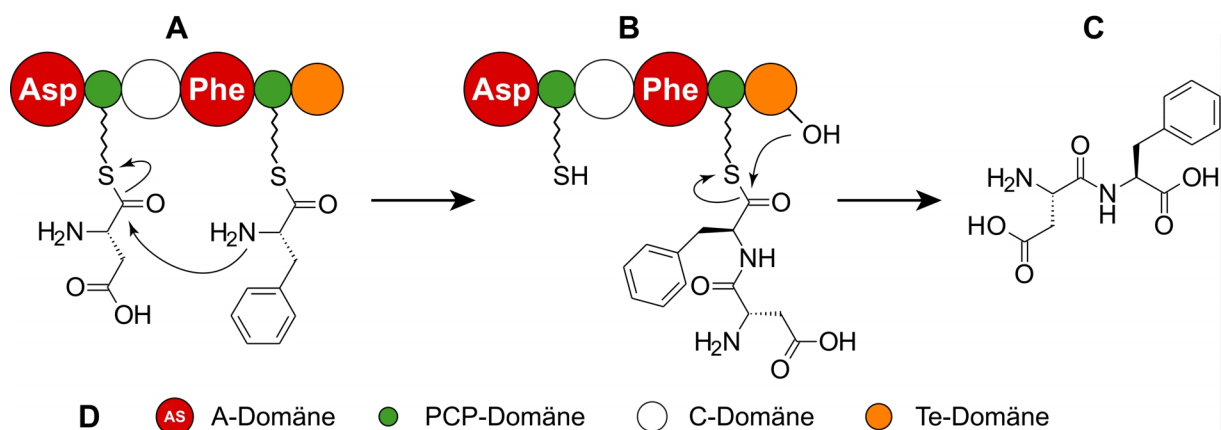


Abb. 5.2: Prinzip der nichtribosomalen Asp-Phe-Synthese. (A) Asp- und Phe-selektive A-Domänen aktivieren die Substrataminosäuren, die als Thioester am 4'-PP-Cofaktor gebunden werden. Die C-Domäne katalysiert die Bildung der Peptidbindung. (B) Von der zweiten PCP-Domäne wird das gebildete Dipeptid auf den Serin-Rest des katalytischen Zentrums der Te-Domäne übertragen, die dann das Asp-Phe-Produkt (C) freisetzt. (D) Farbcodierung der Domänen.

Die Synthese von Asp-Phe an einem nichtribosomalen Enzym-Templat erfordert eine dimodulare Peptidsynthetase, welche die notwendigen Domänen für

die Erkennung und Aktivierung der Substrate, für die Katalyse der Peptidbindungs-knüpfung und die Termination der Biosynthese enthält (siehe Abb. 5.2).

Nach den Richtlinien der nichtribosomalen Peptidsynthese muss eine solche Asp-Phe-Synthetase ein N-terminales Initiationsmodul, bestehend aus einer Asp-aktivierenden A-Domäne und einer PCP-Domäne, besitzen. Das zweite Modul erfordert eine peptidbindungs-knüpfbende C-Domäne, eine Phe-aktivierende A-Domäne sowie eine weitere PCP-Domäne. An dieses zweite PCP schließt sich dann C-terminal eine Te-Domäne an, welche die Produktfreisetzung katalysiert. Eine Asp-Phe-Synthetase besitzt demnach die Domänenorganisation A(Asp)-PCP-C-A(Phe)-PCP-Te (Selektivitäten der A-Domänen in Klammern).

5.1.1 Die rationale Entwicklung der Asp-Phe-Synthetasen

Für die Konstruktion der hybriden Asp-Phe-Synthetasen wurden die erforderlichen Domänen aus den beiden gut untersuchten Biosynthesesystemen des Surfactins aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332 und des Tyrocidins aus *Bacillus brevis* ATCC 8185 verwendet (siehe Abb. 5.3).

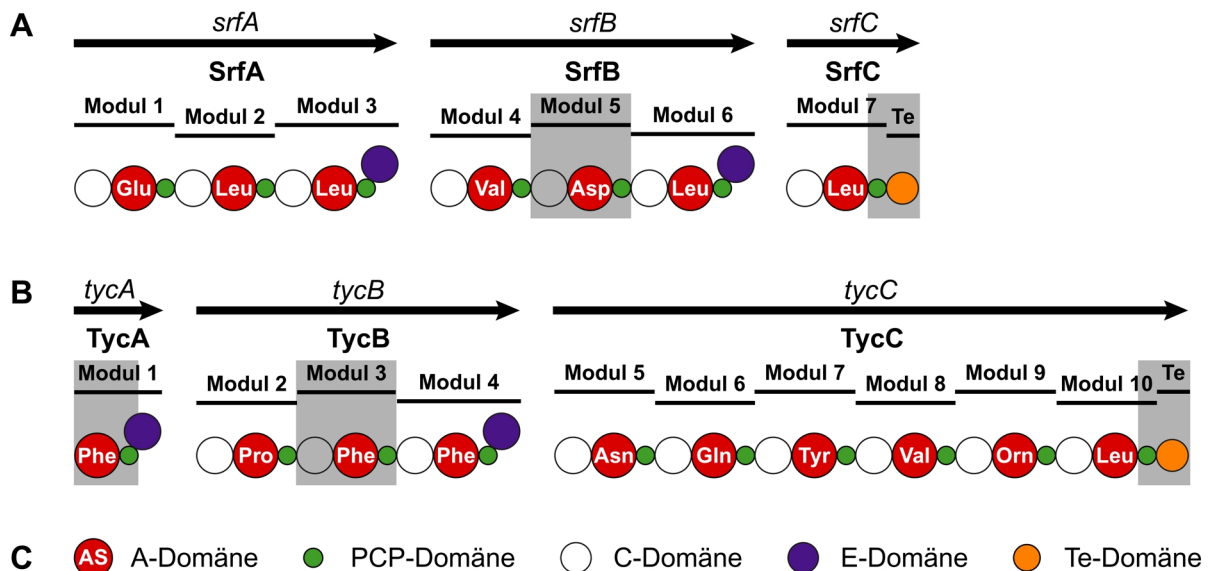


Abb. 5.3: Surfactin- und Tyrocidin-Biosyntheseoperons. (A) In *Bacillus subtilis* ATCC 21332 codieren die Gene *srfA*, *srfB* und *srfC* für die Surfactinsynthetasen SrfA, SrfB und SrfC. SrfA und SrfB setzen sich aus jeweils drei Modulen zusammen. SrfC besteht aus einem Elongationsmodul mit C-terminaler Te-Domäne. (B) *Bacillus brevis* ATCC 8185 synthetisiert Tyrocidin an insgesamt drei Synthetasen (TycA, B und C), die von den Genen *tycA*, *tycB* und *tycC* codiert werden. TycA besteht aus einem Initiationsmodul, TycB besteht aus drei und TycC aus sechs Modulen. Domänen oder Module, die zur Konstruktion der Asp-Phe-Synthetasen verwendet wurden, sind grau unterlegt. (C) Farbcodierung der Domänen.

Insgesamt wurden sechs Asp-Phe-Synthetasen konstruiert und untersucht (siehe Abb. 5.4). Die Fusionen erfolgten auf DNA-Ebene durch Einführung artifizieller Schnittstellen (vgl. Kapitel 4.1.1.1).

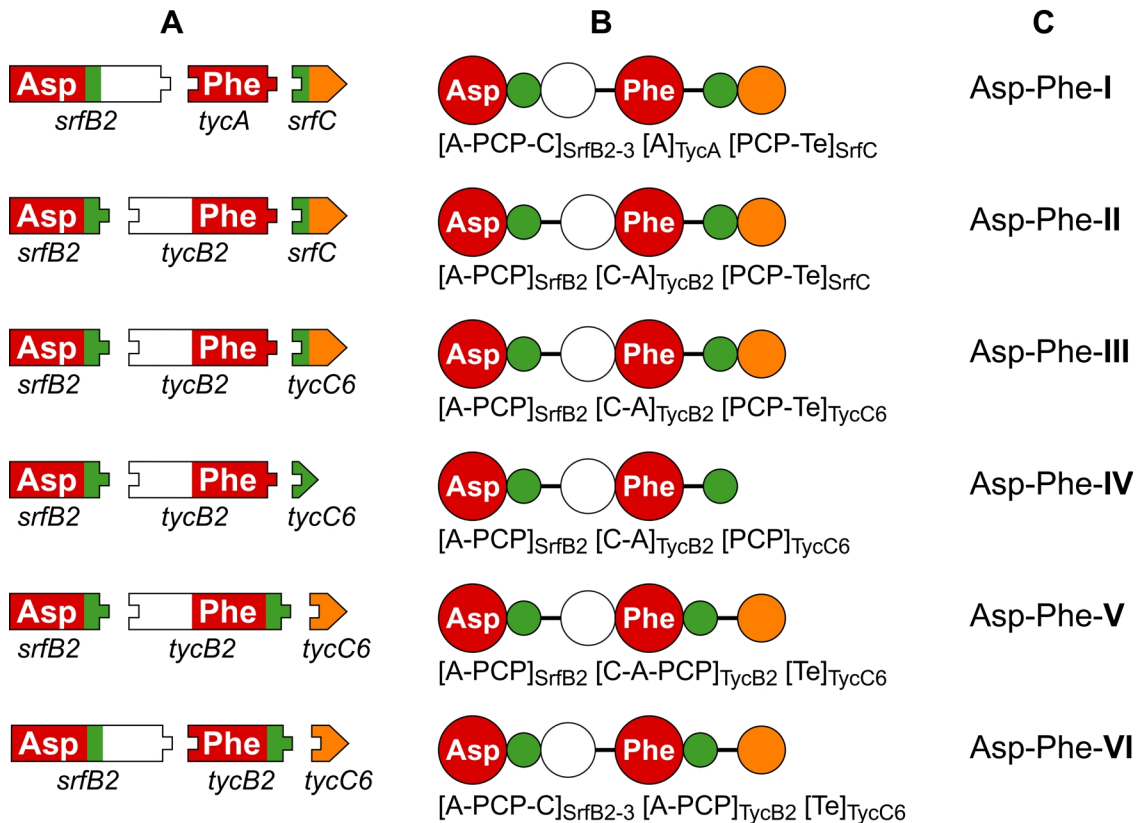


Abb. 5.4: Dimodulare, hybride Asp-Phe-Synthetasen. (A) Durch Kombination der entsprechenden DNA-Fragmente wurden die für die Dimodule codierenden Gene zusammengestellt. (B) Auf Proteinebene liegen die Fusionsstellen in den Interdomänen-Linkern. Die Fusionsstellen sind durch Linien zwischen den Domänen dargestellt. In der Beschreibung sind natürlich zusammengehörige Domänen durch eckige Klammern gekennzeichnet. In den Indizes sind die Ursprungsmodule der Domänen angegeben. (C) Die Konstrukte wurden als Asp-Phe-I bis Asp-Phe-VI bezeichnet.

Das Hybridenzym Asp-Phe-I setzt sich aus den Domänen A, PCP und C der Module 2 und 3 der Surfactin-Synthetase B (*SrfB2-3*), der A-Domäne aus der Tyrocidin-Synthetase A (*TycA*) und der PCP-Te-Einheit von *SrfC* zusammen, besitzt also die Domänenorganisation [A-PCP-C]_{SrfB2-3}-[A]_{TycA}-[PCP-Te]_{SrfC} (nativ zusammengehörige Domänen sind durch eckige Klammern, Fusionsstellen durch Bindestriche zwischen den Klammern gekennzeichnet, Indizes geben den Ursprung der Domänen an). Dieses Konstrukt, dass zu Beginn dieser Arbeit bereits beschrieben war [Doekel, 2000], besitzt zwei Besonderheiten:

i) Die Phe-aktivierende A-Domäne ist im natürlichen System Bestandteil des Initiationsmoduls von TycA. Es ist nicht bekannt, ob solche Domänen in künstlichen Elongationsmodulen uneingeschränkte Funktionalität besitzen.

ii) Es wurde gezeigt, dass C-Domänen eine Substrat-Spezifität auf der Akzeptor-Seite besitzen und daher die natürliche Einheit von C- und nachfolgender A-Domäne erhalten bleiben sollte [Belshaw et al., 1999; Mootz et al., 2000] (vgl. Kapitel 2.3.1). Im Fall des Asp-Phe-I wurde aber die Fusion zwischen C- und A-Domäne gelegt. Die C_{SrfB3}-Domäne erkennt in ihrem nativen Zusammenhang das enzymgebundene Leucin, in der hybriden Synthetase muss sie aber trotz ihrer intrinsischen Leu-Spezifität in der Akzeptor-Position Phenylalanin erkennen und umsetzen.

Beide Eigenschaften könnten die Funktionalität und damit die enzymatische Effizienz dieser Asp-Phe-Synthetase beeinflussen. Aus diesem Grund wurde das Hybridenzym Asp-Phe-II konstruiert, welches neben dem künstlichen Initiationsmodul [A-PCP]_{SrfB2} die C und A-Domäne von TycB2 und die PCP-Te-Einheit von SrfC enthält. Daraus folgt die Zusammensetzung [A-PCP]_{SrfB2}-[C-A]_{TycB2}-[PCP-Te]_{SrfC}. In diesem Konstrukt besteht die natürliche Verbindung zwischen der C-Domäne mit Phe-Spezifität auf der Akzeptor-Seite und der Phe-aktivierenden A-Domäne, sodass in diesem Konstrukt limitierende Auswirkungen der C-Domänen-Spezifität auszuschließen sind.

Unter dem Aspekt, eine möglichst hohe Produktivität zu erreichen, sollten die Te-Domänen bezüglich der Umsatzrate untersucht werden. Dazu wurden im Konstrukt Asp-Phe-III ([A-PCP]_{SrfB2}-[C-A]_{TycB2}-[PCP-Te]_{TycC6}) statt der PCP-Te-Einheit des Srf-Systems die PCP- und Te-Domäne von TycC6 verwendet.

Das Enzym Asp-Phe-IV ([A-PCP]_{SrfB2}-[C-A]_{TycB2}-[PCP]_{TycC6}), dem die C-terminale Te-Domäne fehlt, wurde konstruiert, um die Bedeutung der produktabspaltenden Te-Domäne für die Produktivität der hybriden Synthetase zu prüfen.

Fusionen von Te-Domänen wurden bislang nach zwei veröffentlichten Strategien durchgeführt [Doekel & Marahiel, 2000][Schwarzer et al., 2001]. In den Konstrukten Asp-Phe-I bis Asp-Phe-III wurde die Te-Domäne in Einheit mit ihrem nativen PCP fusioniert. In anderen Studien wurde die Te-Domäne jedoch C-terminal an die PCP-Domäne des letzten Elongationsmoduls einer Hybridsynthetase fusioniert. Um die Auswirkungen beider Varianten auf die Aktivität der Synthetasen

zu untersuchen, wurde das Enzym Asp-Phe-**V** ([A-PCP]_{SrfB2}-[C-A-PCP]_{TycB2}-[Te]_{TycC6}) konstruiert. In diesem Fall bleibt also die natürliche Kommunikation zwischen Phe-A-Domäne und benachbarter PCP-Domäne bestehen, sodass eine mögliche Verringerung der Übertragungsrate des Phenylalaninyl-Adenylats auf die benachbarte PCP-Domäne auszuschließen ist.

Das sechste Enzym Asp-Phe-**VI** ([A-PCP-C]_{SrfB2}-[A-PCP]_{TycB2}-[Te]_{TycC6}) sollte die Auswirkung der Fusion zwischen C- und A-Domäne im Vergleich zu Asp-Phe-**V** verdeutlichen, ohne dass Domänen eines nativen Initiationsmoduls Teile eines künstlichen Elongationsmoduls bilden, wie es in der Synthetase Asp-Phe-**I** der Fall ist.

5.1.2 Konstruktion, Expression und Reinigung der Asp-Phe-Synthetasen

Durch Kombination der codierenden Genfragmente wurden die entsprechenden Domänen innerhalb der Interdomänen-Linker fusioniert. Bezogen auf die Aminosäuresequenz lagen die Fusionen zwischen C- und A-Domäne 91 Aminosäuren stromabwärts des *core*-Motivs C7 der C-Domäne und 40 Aminosäuren stromaufwärts des A-Domänen-Motivs A1. Fusionen mit PCP-Domänen (PCP-C, A-PCP und PCP-Te) wurden 38 bis 40 Aminosäuren stromaufwärts oder –abwärts des invarianten Serin-Rests des PCP durchgeführt (*core*-Motive im Anhang 8.1).

Das artifizielle Initiationsmodul besteht bei allen Asp-Phe-Synthetasen aus der Asp-aktivierenden A- und der PCP-Domäne des zweiten Moduls der Surfactin-Synthetase B (SrfB2). Bei diesem Modul handelt es sich nicht um ein typisches Initiations-, sondern vielmehr um ein Elongationsmodul. Es konnte jedoch in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Elongationsmodule nach Entfernen der N-terminalen C-Domäne zur Initiation der Peptidbiosynthese befähigt sind [Linne & Marahiel, 2000].

Aufgrund verschiedener Fusionsstrategien besitzen die Asp-Phe-Hybride C-Domänen unterschiedlichen Ursprungs. Bei der Fusion zwischen C- und der Phe-aktivierenden A-Domäne in den Konstrukten Asp-Phe-**I** und Asp-Phe-**VI** stammt die C-Domäne aus dem SrfB3-Modul. Im Gegensatz dazu enthalten die übrigen Konstrukte Asp-Phe-**II-V**, bei denen die natürliche C-A-Einheit erhalten wurde, die C-Domäne aus dem zweiten Modul der Tyrocidin-Synthetase B (TycB2).

Während das erste Konstrukt die Phenylalanin aktivierende A-Domäne aus TycA trägt, besitzen die anderen Konstrukte die A-Domäne aus dem Modul TycB2 des Tyrocidin-Biosyntheseoperons. Te-Domänen beziehungsweise PCP-Te-

Einheiten aus beiden Biosynthesystemen, Srf und Tyc, wurden für die Herstellung der unterschiedlichen Konstrukte verwendet.

Die entsprechenden Gene wurden mittels PCR amplifiziert und zu Vektoren kombiniert, die auf den Plasmiden pQE60 oder pQE70 basieren. Auf diese Weise wurden die Expressionsvektoren pAspPhe-1 bis pAspPhe-6 erhalten (siehe Kapitel 4.1.1.1). *E. coli* BL21/pRep4[gsp]-Zellen wurden für die Expression der rekombinanten Gene genutzt (Kapitel 3.4.3). Dabei wurde durch Coexpression des *gsp*-Gens auf dem Helferplasmid pREP4[gsp], welches für die PPTase Gsp codiert, die Modifikation der produzierten Enzyme in die aktive *holo*-Form sichergestellt. Bedingt durch die Verwendung der pQE-Vektoren besitzen alle Asp-Phe-Synthetasen einen C-terminalen His₆-tag. Daher konnten sie mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Ni²⁺-IMAC) gereinigt werden (beispielhaft siehe Abb. 5.5).

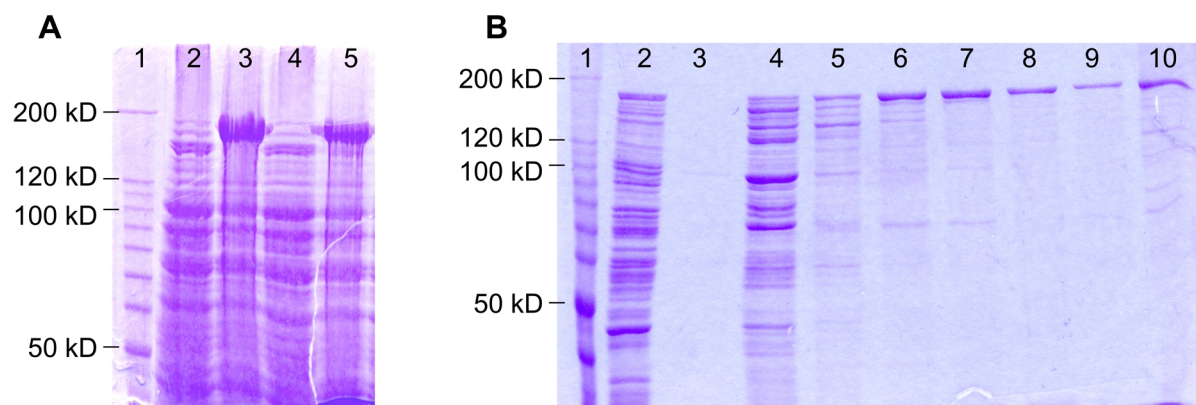


Abb. 5.5: Überproduktion und Reinigung der Asp-Phe-Synthetase Asp-Phe-III. (A) Coomassie-Blau gefärbtes Polyacrylamidgel der Testexpressionen. Spur 1: Proteinmarker, Spuren 2+4: Gesamtzellextrakt ohne Induktion, Spuren 3+5: Gesamtzellextrakt nach zweistündiger Induktion mit IPTG. (B) Coomassie-Blau gefärbtes Polyacrylamidgel der Ni²⁺-IMAC-Reinigung von Asp-Phe-III. Spur 1: Proteinmarker, Spur 2: Rohzellextrakt, Spuren 3-5: Durchfluß, Spuren 6-10: Fraktionen des gereinigten Enzyms.

5.1.3 Biochemische Charakterisierung

Zunächst wurde die Aktivität der hybriden Asp-Phe-Synthetasen in Bezug auf Aktivierung der Substrataminosäuren und deren kovalente Bindung am 4'-PP-Cofaktor untersucht.

5.1.3.1 ATP-PP_i-Austauschreaktion

Die A-Domänen sind verantwortlich für die Erkennung und Aktivierung der Substrate. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird, unter Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat (PP_i), das Aminoacyl-Adenylat gebildet. Die Analyse der Adenylierungsreaktion der A-Domänen erfolgte durch die ATP-PP_i-Austauschreaktion, bei der zugesetztes [³²P]-PP_i in der Rückreaktion der Aminosäureaktivierung in ATP eingebaut wird. Die Menge des gebildeten [³²P]-ATPs kann somit als Maß für die Aktivierung der eingesetzten Aminosäure herangezogen werden. Die ATP-PP_i-Austauschreaktion wurde analog der Beschreibung in Kapitel 4.2.6.1 durchgeführt. Für die Untersuchung der Substratspezifität der A-Domänen in den Asp-Phe-Synthetasen wurden alle proteinogenen Aminosäuren sowie D-Phenylalanin getestet.

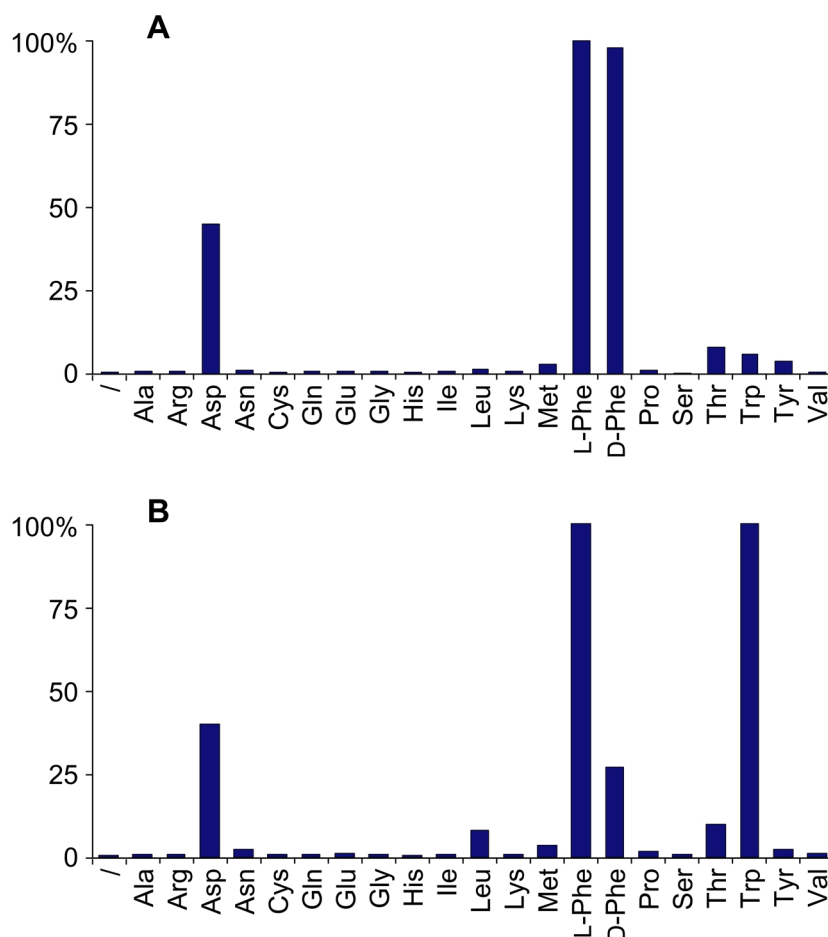


Abb. 5.6: ATP-PP_i-Austauschreaktion. (A) Substratspezifität des Konstruktes Asp-Phe-I. Die höchste Aktivität wurde gleich 100% gesetzt. Neben den erwarteten Aminosäuren L-Asp und L-Phe wird auch D-Phe aktiviert. (B) Substratspezifität des Enzyms Asp-Phe-III. Asp und Phe wurde von diesem Konstrukt deutlich aktiviert. Hohe Selektivität wurde auch für Trp gefunden.

Abbildung 5.6 (A) zeigt das Ergebnis der ATP-PP_i-Austauschreaktion für Asp-Phe-I. Wie erwartet, werden die Substratamino­säuren L-Asp (45%) und L-Phe (100%) durch die A-Domänen aktiviert (die höchste Inkorporation von [³²P]-PP_i in ATP wurde

gleich 100% gesetzt). Die Phe-aktivierende A-Domäne aus TycA aktiviert auch das Enantiomer D-Phe (98%). Weitere, geringere Nebenspezifitäten wurden für L-Thr (8%), L-Trp (6%), L-Tyr (4%) und L-Met (3%) gefunden. Die Aktivitäten der nicht fusionierten, einzeln produzierten und gereinigten Asp- und Phe-aktivierenden A-Domänen sind hier nicht gezeigt, wurden aber bereits beschrieben [Doekel, 2000]. Danach kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivitäten der hier verwendeten A-Domänen nicht durch die Fusionen beeinflusst sind.

Die Asp-Phe-Synthetasen Asp-Phe-II bis VI wurden unter Verwendung der Phe-aktivierenden A-Domäne von TycB2 konstruiert. Die durch die ATP-PP_i-Austauschreaktionen ermittelten Substratselektivitäten sind in diesen Konstrukten nahezu identisch und damit unabhängig von der Fusionsstrategie. Abbildung 5.6 (B) zeigt die Ergebnisse der ATP-PP_i-Austauschreaktion am Beispiel des Hybridenzym Asp-Phe-III. Die Aktivierung der kognaten Aminosäuren L-Asp (40%) und L-Phe (100%) entspricht dem des Enzyms Asp-Phe-I. Die Aktivierung von D-Phe ist im Vergleich geringer (27%), allerdings besitzt die TycB2-A-Domäne wie zuvor beschrieben eine hohe Selektivität für L-Trp (100%) [Mootz & Marahiel, 1997]. Andere, geringe Selektivitäten wurden für L-Thr (10%) und L-Leu (8%) gefunden.

5.1.3.2 Beladungsreaktion

Nach der Aktivierung als Aminoacyl-Adenylat werden die Aminosäuren in der Beladungsreaktion unter Abspaltung von AMP kovalent als Thioester am 4'-PP-Cofaktor der PCP-Domäne gebunden. Aufgrund der Thioesterbildung wird die Beladungsreaktion auch als Thiolierung bezeichnet. In der Analyse der Beladungsreaktion wird also die Funktionalität der PCP-Domäne sowie die Effektivität der notwendigen posttranslationalen Modifikation mit dem 4'-PP-Cofaktor untersucht (Durchführung siehe Kapitel 4.2.6.2). Damit verbunden lassen sich auch Aussagen über die Domänenkommunikation zwischen A- und PCP-Domäne treffen. Durch die Verwendung radioaktiv markierter Aminosäuren kann die Effizienz der Beladungsreaktion direkt verfolgt werden.

Durch die Coexpression des *gsp*-Gens wurde, katalysiert durch die PPTase Gsp, die *in vivo*-Modifikation der überproduzierten Asp-Phe-Synthetasen in die aktive *holo*-Form sichergestellt. In Abhängigkeit von ATP zeigten alle Hybridenzyme Beladungsaktivität, wenn sie mit den radioaktiv markierten Aminosäuren [¹⁴C]-L-Asp

oder [^{14}C]-L-Phe inkubiert wurden. Unabhängig von der Art der Konstruktion, konnten für alle Asp-Phe-Synthetasen vergleichbare Beladungsaktivitäten gemessen werden. Durchschnittlich 10 bis 15% des eingesetzten Enzyms wurde mit [^{14}C]-L-Asp und 35 bis 45% mit [^{14}C]-L-Phe beladen (beispielhaft siehe Abb. 5.7).

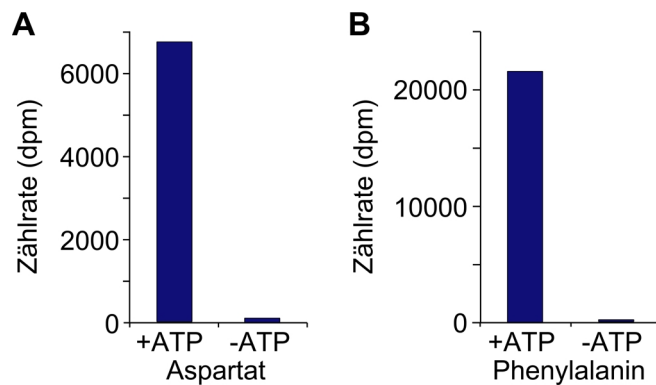


Abb. 5.7: Beladungsreaktion des Asp-Phe-Konstrukts Asp-Phe-III. Beide Substrataminosäuren konnten kovalent an den 4'-PP-Cofaktor des PCPs gebunden werden. Alle Asp-Phe-Synthetasen zeigen vergleichbare Beladungsreaktionen.

Eine nachträgliche *in vitro* Modifikation mit Hilfe einer PPTase (vgl. Kapitel 4.2.7) führte nicht zu einer Erhöhung der Beladungsaktivität, sodass davon auszugehen ist, dass die *in vivo*-Modifikation durch die PPTase Gsp vollständig verlaufen ist. Die Analysen der Thiolierungsreaktion zeigen, dass auch in den rekombinanten Asp-Phe-Synthetasen die Translokation der aktivierten Aminosäuren auf den 4'-PP-Cofaktor der PCP-Domänen gewährleistet ist.

5.1.4 Analyse der Produktbildung

Nachdem durch ATP-PP_i-Austausch- und Beladungsreaktion gezeigt werden konnte, dass die Asp-Phe-Synthetasen in Substrataktivierung und -bindung funktional sind, wurden Untersuchungen zur Produktbildung durchgeführt. Dazu wurden die Hybridenzyme in Anwesenheit der Substrataminosäuren, Aspartat und Phenylalanin, und ATP bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Reaktionen direkt abgestoppt (vgl. Kapitel 4.3.2). Anschließend wurden die enzymatischen Produkte wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben durch HPLC/MS-Analyse untersucht.

Die HPLC-Untersuchungen zeigten zwei Produktsignale, bei 17,2 und 18,2 min, die in Abhängigkeit beider Substrataminosäuren und ATP auftraten und zeitabhängig zunahmen. Durch gekoppelte ESI-MS-Analysen und Vergleiche mit Asp-Phe-Standardverbindungen konnte das deutlichere Signal bei 18,2 min dem

Dipeptid Asp-Phe mit einer Masse von 281 m/z zugeordnet werden (berechnete Masse des Asp-Phe: $[M+H]^+ = 281$ m/z) (siehe Abb. 5.8).

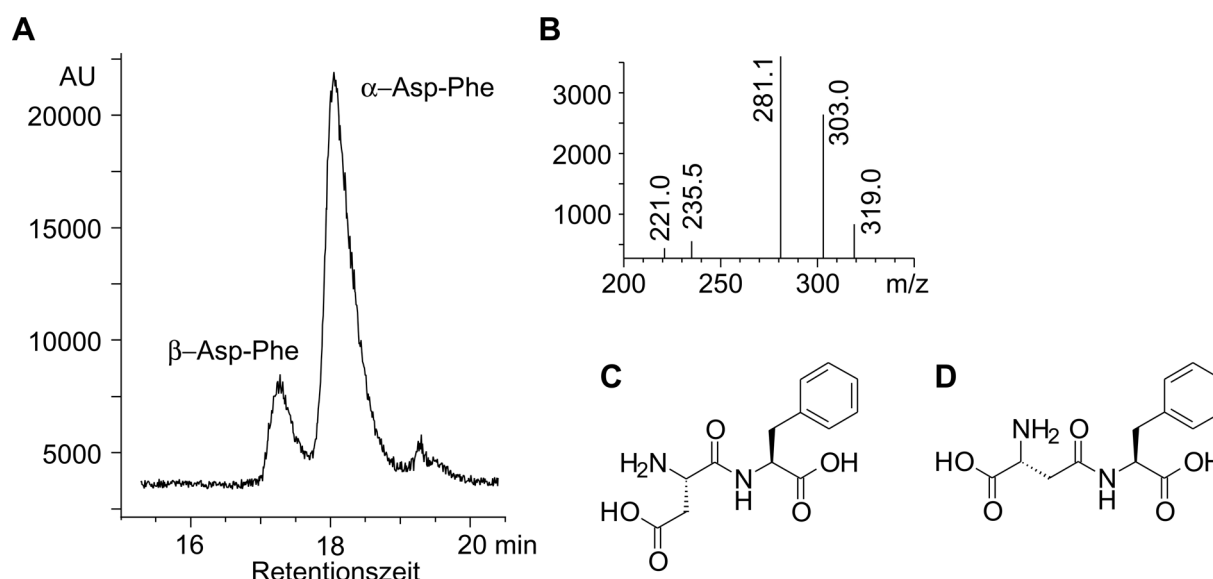


Abb. 5.8: HPLC/MS-Analyse der Produktbildung der Synthetase Asp-Phe-I. (A) Das HPLC/MS-Diagramm zeigt, dass in Gegenwart von ATP und den Substratamino­säuren zwei Produkte gebildet werden. (B) Durch das Massenspektrum und den Vergleich mit Standardverbindungen konnte das Hauptproduktes als α-Asp-Phe (berechnete Masse von Asp-Phe: $[M+H]^+ = 281$ m/z) identifiziert werden. (C) Struktur von α-Asp-Phe und (D) β-Asp-Phe.

Neben diesem erwarteten Produkt konnte ein weiteres Signal bei einer Retentionszeit von 17,2 min detektiert werden. Durch Vergleich mit Standardsubstanzen wurde es dem Dipeptid β-L-Aspartyl-L-Phenylalanin (β-Asp-Phe) zugeordnet (Abb. 5.8). β-Asp-Phe entsteht durch die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen der Aminogruppe des Phenylalanins und der β-Carboxylgruppe des Aspartats [Doekel, 2000]. Weitere Nebenprodukte, wie andere Dipeptide oder Asp-Phe-Diketopiperazin (Asp-Phe-DKP), konnten nicht nachgewiesen werden.

Durch zeitabhängige Messungen und Vergleich zu Standardreihen wurde die Umsatzrate k_{cat} der einzelnen Asp-Phe-Synthetasen ermittelt. Dabei zeigten sich deutliche Produktivitätsunterschiede in Bezug auf die Umsatzrate und das Verhältnis von erwünschtem α-Asp-Phe zum Nebenprodukt β-Asp-Phe (α/β-Verhältnis). Die beobachteten Produktbildungseigenschaften sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst (α/β-Verhältnis als Anteile an der Gesamtproduktmenge in %).

Tabelle 5.1: Produktivität der Asp-Phe-Synthetasen

| Enzym | Domänenorganisation | Umsatzrate (k_{cat}) | α/β - Verhältnis |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Asp-Phe-I | [A-PCP-C] _{SrfB2-3} -[A] _{TycA} -[PCP-Te] _{SrfC} | 0.12 min ⁻¹ | 83:17 |
| Asp-Phe-II | [A-PCP] _{SrfB2} -[C-A] _{TycB2} -[PCP-Te] _{SrfC} | 0.27 min ⁻¹ | 92:8 |
| Asp-Phe-III | [A-PCP] _{SrfB2} -[C-A] _{TycB2} -[PCP-Te] _{TycC6} | 0.70 min ⁻¹ | 100:0 |
| Asp-Phe-IV | [A-PCP] _{SrfB2} -[C-A] _{TycB2} -[PCP] _{TycC6} | 0.01 min ⁻¹ | 81:19 |
| Asp-Phe-V | [A-PCP] _{SrfB2} -[C-A-PCP] _{TycB2} -[Te] _{TycC6} | 0.08 min ⁻¹ | 75:25 |
| Asp-Phe-VI | [A-PCP-C] _{SrfB2-3} -[A-PCP] _{TycB2} -[Te] _{TycC6} | 0.07 min ⁻¹ | 75:25 |

Für die Asp-Phe-Synthetasen, die eine C-terminale Te-Domäne besitzen, wurden Umsatzraten zwischen 0,07 und 0,7 min⁻¹ ermittelt. Das α/β -Verhältnis variiert bei diesen Enzymen zwischen 75:25 und 100:0. Im Gegensatz hierzu konnte für das Hybrid-Enzym Asp-Phe-IV, die einzige Synthetase ohne produktfreisetzende Te-Domäne, eine erwartete geringe Reaktionsgeschwindigkeit von 0,01 min⁻¹ beobachtet werden, wodurch die Bedeutung der enzymatisch katalysierten Termination der Peptidsynthese belegt wird. Wegen der marginalen Produktivität konnte für Asp-Phe-IV das α/β -Verhältnis nur näherungsweise bestimmt werden (α/β : 81:19).

Die geringste Effizienz einer Asp-Phe-Synthetase mit Te-Domäne wurde für Asp-Phe-VI beobachtet ($k_{\text{cat}} = 0,07 \text{ min}^{-1}$). Gleichzeitig zeigt dieses Konstrukt die größte Menge an Nebenprodukt (α/β -Verhältnis: 75:25). Bei gleichem Verhältnis von Haupt- zu Nebenprodukt, besaß Asp-Phe-V nur eine wenig bessere Umsatzrate ($k_{\text{cat}} = 0,08 \text{ min}^{-1}$, α/β -Verhältnis: 75:25).

Deutlich höhere Produktivität und bessere α/β -Verhältnisse wurden bei der Analyse der Hybridenzyme Asp-Phe-I ($k_{\text{cat}} = 0,12 \text{ min}^{-1}$, α/β : 83:17) und Asp-Phe-II ($k_{\text{cat}} = 0,27 \text{ min}^{-1}$, α/β : 92:8) gefunden.

Die höchste Produktivität wurde bei der Hybridsynthetase Asp-Phe-III beobachtet. Unter gleichen Bedingungen ist Asp-Phe-III das einzige Enzym, welches die Substrate ausschließlich zum erwarteten Dipeptid α -Asp-Phe verknüpft. Bei einer

Umsatzrate von $0,7 \text{ min}^{-1}$ konnte kein β -Asp-Phe-Nebenprodukt nachgewiesen werden.

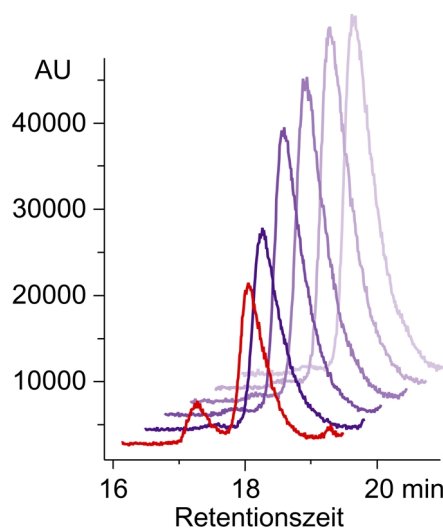


Abb. 5.9: Vergleich der Asp-Phe-Produktion. HPLC/MS-Analyse der Asp-Phe-Produktion: In blau die HPLC/MS-Diagramme vom Enzym Asp-Phe-III nach 30, 60, 120, 240 und 300 min. Zum Vergleich in rot das HPLC/MS-Diagramm der Synthetase Asp-Phe-I nach 60 min.

Ein Vergleich von HPLC/MS-Chromatogrammen der Produktanalysen der Enzyme Asp-Phe-I und Asp-Phe-III veranschaulicht die besonderen Eigenschaften von Asp-Phe-III (siehe Abb. 5.9). Während Asp-Phe-I bei einer geringen Umsatzrate deutlich die Produktion von β -Asp-Phe aufweist, läuft die α -Asp-Phe-Synthese beim Asp-Phe-III auch über einen Zeitraum von bis zu 300 min ohne Bildung des Nebenproduktes ab.

Vergleicht man die ermittelten Daten aller Asp-Phe-Synthetasen, so zeigt sich ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Asp-Phe-Bildung und dem Verhältnis der Produkte. Besonders deutlich wird diese Korrelation in der graphischen Darstellung (siehe Abb. 5.10). Berücksichtigt sind hier die Synthetasen, die eine C-terminale Te-Domäne besitzen, da die Umsatzrate des Enzyms Asp-Phe-IV ohne Te-Domäne zu gering war, um das exakte Produktverhältnis ermitteln zu können. Der maximale Anteil des β -Asp-Phe liegt bei 25%. Je höher die Umsatzrate, desto geringer fällt dieser Anteil am Gesamtprodukt aus. Im Fall des Enzyms Asp-Phe-III arbeiten die Domänen so effizient, dass die Nebenproduktbildung vollständig unterbunden wird. Durch eine Optimierung der Asp-Phe-Synthetasen konnte im Asp-Phe-III wahrscheinlich eine optimale Domäneninteraktion erreicht werden.

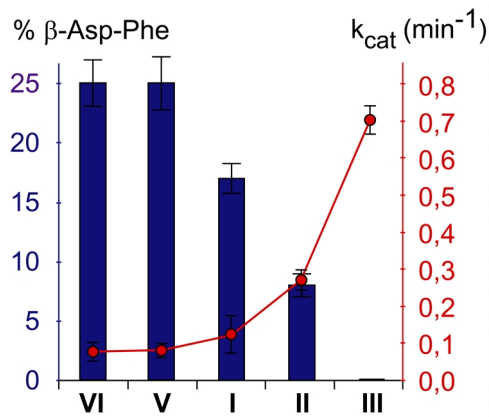


Abb. 5.10: Korrelation der Umsatzrate zur β -Asp-Phe-Menge. Durch vergleichende Auftragung der Umsatzrate und des Anteils von β -Asp-Phe an der Gesamtproduktmenge (in %) wird der Zusammenhang zwischen beiden Größen deutlich. Je größer die Umsatzrate, desto weniger β -Asp-Phe wird gebildet. Dies geht bis zur vollständigen Eliminierung der β -Asp-Phe-Bildung im Fall von Asp-Phe-III. Asp-Phe-IV wurde in dieser Darstellung nicht berücksichtigt.

Die Analyse der Asp-Phe-Synthetasen verdeutlicht die Variabilität der NRPS. Verschieden Strategien können genutzt werden, um hybride Peptidsynthetasen zu entwickeln. Allerdings zeigt das Beispiel der Asp-Phe-Synthetasen durch die Bildung des Nebenproduktes β -Asp-Phe auch, dass eine optimale Domäneninteraktion unerlässlich ist. Bei vergleichbarer A-Domänen- und Beladungsaktivität konnten erhebliche Unterschiede in der Produktivität der Synthetasen festgestellt werden, die durch die Art der Fusion und die Wahl der verwendeten Domänen hervorgerufen wurden.

6 Ergebnisse: Untersuchungen zur Heterozyklisierung in der nichtribosomalen Peptidsynthese

In nichtribosomal synthetisierten Peptiden finden sich häufig Variationen in der Seitenkette der Aminosäuren oder innerhalb des Peptidrückgrats, wobei spezielle Domänen die Einführung solcher Modifikationen katalysieren. Eine besondere modifizierende Domäne ist die Heterozyklisierungs-(Cy)-Domäne, welche die Bildung fünfgliedriger Heterozyklen der Thiazolin- und Oxazolin-Familie katalysiert (vgl. Kapitel 2.3.3). Voraussetzung für diese Zyklisierung ist die Aktivierung der Substrat-aminosäure Cystein, Serin oder Threonin durch die A-Domäne des Moduls, in dem die übliche C-Domäne durch die Cy-Domäne ersetzt ist.

Die Durchführbarkeit von Domänen- und Modulfusionen und damit die Konstruktion funktionaler hybrider Peptidsynthetasen ist für Module mit C-Domänen an verschiedenen Beispielen gezeigt worden [Doekel & Marahiel, 2000; Mootz et al., 2000]. Auch die in Kapitel 5 beschriebene Entwicklung der Asp-Phe-Synthetasen belegen die unterschiedlichen Möglichkeiten der Fusion zum Aufbau von Hybridenzymen. Vergleichbare Untersuchungen mit Modulen, die Cy-Domänen tragen, wurden bislang jedoch nicht durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst ein einfaches Modellsystem entwickelt werden, welches Untersuchungen an der Cy-Domäne *in vitro* ermöglicht. Von diesem Modellsystem ausgehend sollten die Möglichkeiten der Cy-Domäne als Bestandteil artifizieller Synthetasen untersucht werden. Des Weiteren sollte das Modellsystem genutzt werden, um Einblicke in den noch unbekannten Reaktionsmechanismus dieser speziellen Domäne zu erhalten. Dafür sollten durch Mutationsanalyse aktive Reste der Cy-Domäne identifiziert werden, die an der Katalyse der Zyklisierungsreaktion beteiligt sind.

6.1 Entwicklung eines dimodularen Modellsystems

Die geplanten Untersuchungen der Cy-Domäne erforderten ein einfaches aber effektives Modellsystem, das *in vitro* ein heterozyklisches Produkt in ausreichender Menge produzieren kann. Als Grundlage für die folgenden Untersuchungen wurde die Cy-Domäne aus der Bacitracin-Synthetase A (BacA) aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 verwendet (siehe Abb. 6.1).

Das Peptidantibiotikum Bacitracin enthält einen Thiazolin-Ring, der aus den ersten beiden Aminosäuren Isoleucin und Cystein gebildet wird (vgl. Kapitel 2.4). Ein geeignetes Modellsystem schien somit eine dimodulare Peptidsynthetase zu sein, die aus dem Isoleucin aktivierenden Initiationsmodul und dem zweiten Cystein aktivierenden und zyklisierenden Modul besteht. Wie schon in den beschriebenen Asp-Phe-Synthetasen, sollte auch in diesem Fall die Produktabspaltung durch eine fusionierte Te-Domäne katalysiert werden, um *in vitro* eine für Analysen ausreichende Umsatzrate sicherzustellen (siehe Abb. 6.1).

Das resultierende dimodulare Modellsystem (BacA1-2-Te) besitzt demnach die Domänenorganisation A(Ile)-PCP-Cy-A(Cys)-PCP-Te. Bei unbeeinträchtigter Aktivität der A-Domänen und einer uneingeschränkten Funktionalität der Cy-Domäne, sollte dieses Modellsystem das heterozyklische Dipeptid Isoleuciny-Thiazolincystein (Ile-Cys^{Thiazolin}) produzieren.

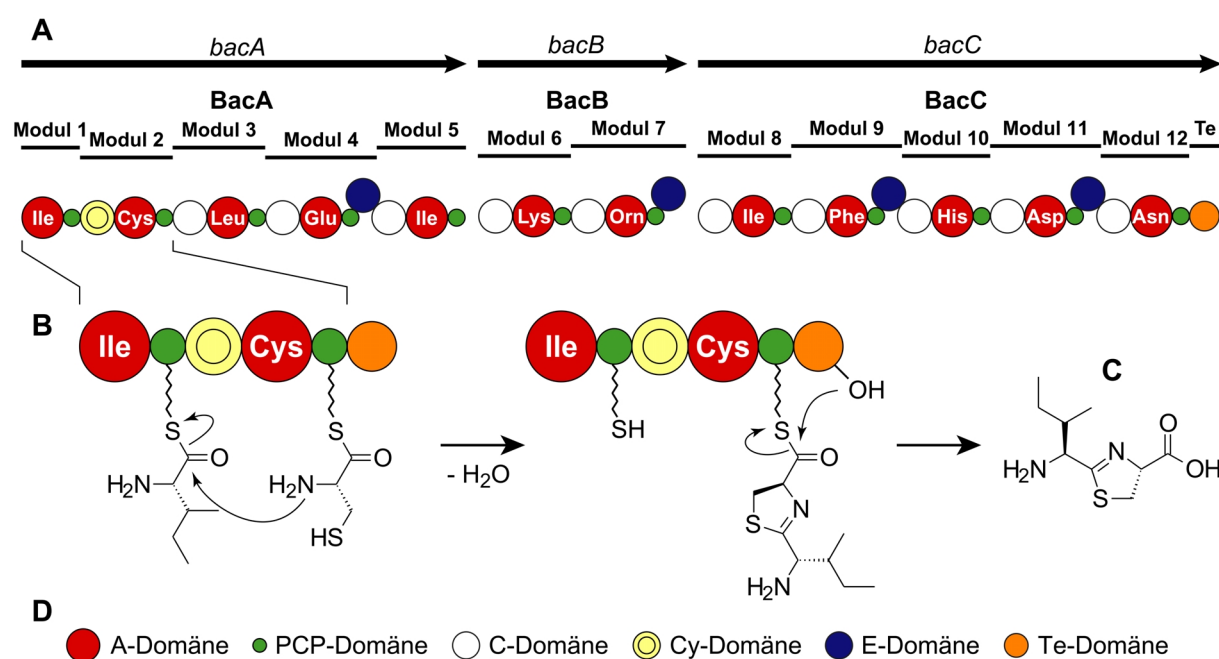


Abb. 6.1: Konstruktion eines dimodularen Modellsystems zur Untersuchung der Cy-Domäne. (A) Als Ursprung des Dimoduls diente die Synthetase BacA des Bacitracin-Biosynthesystems aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. (B) Durch C-terminale Fusion einer Te-Domäne entstand das Modellsystem BacA1-2-Te, welches das heterozyklische Produkt Ile-Cys^{Thiazolin} (C) synthetisieren sollte. (D) Farbcodierung der Domänen.

Frühere Ergebnisse haben gezeigt, dass Te-Domänen in artifiziellen Systemen unterschiedliche Aktivitäten aufweisen [Schwarzer et al., 2001]. Daher sollten bei der Konstruktion des Cy-Domänen-Modellsystems BacA1-2-Te verschiedene Te-Domänen getestet werden. Zu diesem Zweck wurden zum einen die Thioesterase-

Domänen aus der Surfactin- bzw. Tyrocidin-Biosynthese verwendet, welche bereits erfolgreich in hybriden Peptidsynthetasen, z.B. den in Kapitel 5 beschriebenen Asp-Phe-Synthetasen, eingesetzt wurden. Des Weiteren wurde für die Entwicklung eines effizienten dimodularen Modellsystems die Te-Domäne aus dem Yersiniabactin-Biosynthesystem aus *Yersinia pestis* verwendet. Diese Te-Domäne katalysiert in ihrer natürlichen Funktion die hydrolytische Spaltung des Yersiniabactins, welches einen C-terminalen Thiazolin-Ring besitzt und daher Ähnlichkeit zum hier erwarteten Produkt Ile-Cys_{Thiazolin} aufweist [Miller et al., 2002]. Diese Te-Domäne stellte also eine aussichtsreiches Enzym für eine effiziente Produktabspaltung im Modellsystem dar.

6.1.1 Konstruktion, Expression und Reinigung der BacA1-2-Te-Enzyme

Für die Konstruktion der BacA1-2-Te-Synthetasen wurden die entsprechenden Genfragmente mit modifizierten Oligonucleotiden mittels PCR amplifiziert und anschließend in den Expressionsvektor pQE60 kloniert. Die Fusion zwischen dem zweiten PCP und der Te-Domäne erfolgte dabei an der Position 38 Aminosäuren stromabwärts vom invarianten Serin-Rest der PCP-Domäne, wie sie schon früher beschrieben wurde [Schwarzer et al., 2001]. Da die Te-Domänen in ihren Ursprungssystemen immer die C-terminale Domäne bilden, besitzen sie einen natürlichen C-Terminus, der bedingt durch die Klonierungsstrategie um den His₆-tag erweitert wurde, um eine Enzymreinigung mittels Ni²⁺-IMAC zu ermöglichen. Insgesamt drei dimodulare Synthetasen mit der Domänensequenz A(Ile)-PCP-Cy-A(Cys)-PCP-Te wurden konstruiert (siehe Abb. 6.2).

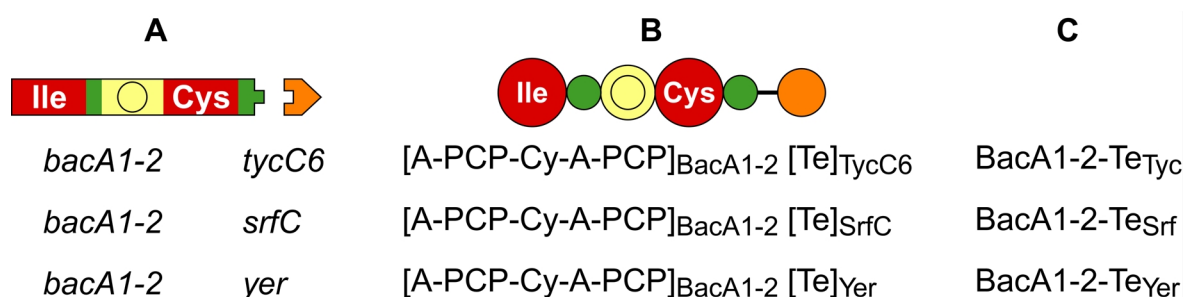


Abb. 6.2: BacA1-2-Te-Konstrukte. (A) Für die Konstruktion des Modellsystems wurden die entsprechenden Genfragmente kombiniert. (B) Drei BacA1-2-Te-Hybridsynthetasen wurden konstruiert, die sich nur in der Te-Domäne unterscheiden. Die Te-Domänen des Tyrocidin-(Tyc)-, Surfactin-(Srf)- und des Yersiniabactin-(Yer)-Biosynthesystems wurden verwendet. (C) In den Bezeichnungen der Hybridenzyme geben Indizes den Ursprung der Te-Domäne an.

Die Überproduktion der BacA1-2-Te-Synthetasen erfolgte in *E. coli* BL21/pRep4[*gsp*]-Zellen unter Verwendung der konstruierten, auf pQE60 basierenden Expressionsvektoren *pbacA1-2-tycTe*, *pbacA1-2-srfTe* bzw. *pbacA1-2-yerTe* (Die Konstruktion dieser Expressionsvektoren ist in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben). Die produzierten Hybridenzyme BacA1-2-Te_{Tyc}, BacA1-2-Te_{Srf} und BacA1-2-Te_{Yer} wurden mittels Ni²⁺-IMAC gereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert.

6.1.2 Biochemische Charakterisierung

6.1.2.1 ATP-PP_i-Austauschreaktion

Voraussetzung für die Produktion des erwarteten Dipeptids Ile-Cys_{Thiazolin} ist die Aktivität der katalytischen Domänen. Die Funktionalität und Selektivität der A-Domänen wurde durch die ATP-PP_i-Austauschreaktion ermittelt (vgl. Kapitel 4.2.6.1), wobei neben den erwarteten Substrataminosäuren, Isoleucin und Cystein, auch alle anderen proteinogenen Aminosäuren verwendet wurden. Unabhängig von der fusionierten Te-Domäne zeigten alle BacA1-2-Te-Hybridenzyme vergleichbare Aktivität in der Adenylierungsreaktion.

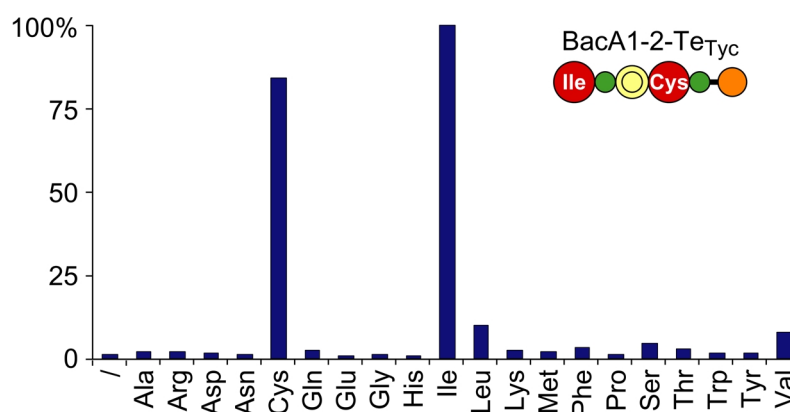
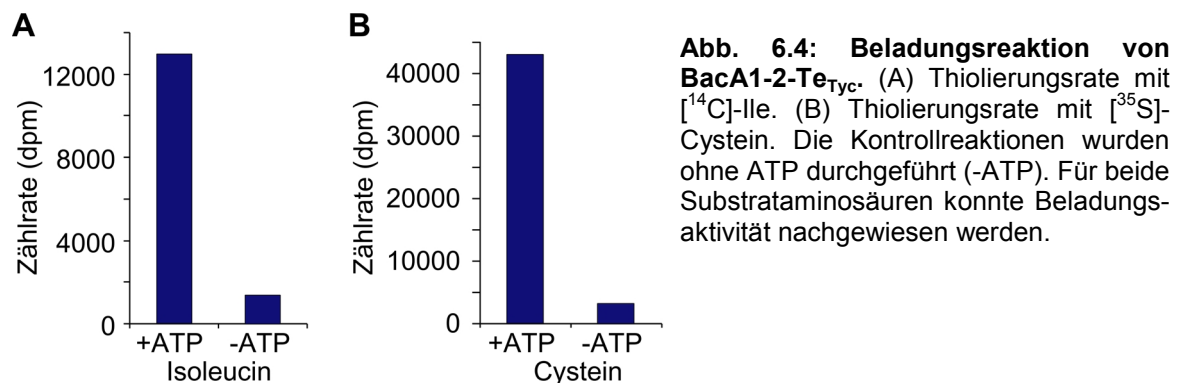


Abb. 6.3: Substratselektivität der BacA1-2-Te-Konstrukte. Gezeigt sind die ATP-PP_i-Austauschraten am Beispiel des Konstrukts BacA1-2-Te_{Tyc}. Die höchste Aktivität wurde gleich 100% gesetzt. Neben den erwarteten Aminosäuren Ile und Cys, wurden geringe Selektivitäten für Leu, Val, und Ser gefunden.

Die höchsten Austauschraten wurden für die erwarteten Aminosäuren Ile (100%) und Cys (84%) detektiert. Geringe Selektivitäten wurden für Leu (10%), Val (8%) und Ser (4%) gefunden (siehe Abb. 6.3).

6.1.2.2 Beladungsreaktion

In der Beladungsreaktion wurde untersucht, ob die aktivierten Aminosäuren auf die PCP-Domänen übertragen werden. Da das für die PPTase Gsp codierende Gen coexprimiert wurde, war zu erwarten, dass die Hybridenzyme nach der Reinigung in der aktiven *holo*-Form vorlagen. Die Analyse der Beladung erfolgte wie in Kapitel 4.2.6.2 beschrieben mit den radioaktiv markierten Aminosäuren [^{14}C]-Ile und [^{35}S]-Cys. Beide Substrate konnten kovalent an den BacA1-2-Te-Enzymen gebunden werden (siehe Abb. 6.4). Die erwartete Thiolierung zwischen dem 4'-PP-Cofaktor der PCP-Domäne und den Substrataminosäuren ist also in diesen Konstrukten gewährleistet.



6.1.3 Produktbildung

Nach der Bestimmung der Einzelaktivitäten der Adenylierungs- und Beladungsreaktion wurden die drei BacA1-2-Te-Konstrukte auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das erwartete Produkt Ile-Cys_{Thiazolin} zu bilden. Die Produktanalyse erfolgte durch zwei verschiedene Methoden.

6.1.3.1 Dünnschichtchromatographie

Zunächst wurde die Produktbildung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. Dazu wurden zur Analyse der Beladungsreaktion identische Ansätze verwendet. Die Enzyme wurden mit ATP, Cystein und radioaktiv markiertem [^{14}C]-Isoleucin inkubiert (vgl. Kapitel 4.3.1). Nach Inkubation über bestimmte Zeitintervalle wurden die Reaktionen mit TCA abgestoppt, die Proben aufgearbeitet und anschließend auf DC-Platten aufgetragen. Die Auswertung der DC-Platten erfolgte dann durch Autoradiographie (vgl. Kapitel 4.3.1).

Die zeitabhängigen DC-Analysen der Hybridenzyme BacA1-2-Te_{Tyc} und BacA1-2-Te_{Yer} zeigten jeweils zwei Signale, die sich im Laufe der Reaktion veränderten (siehe Abb. 6.5). Das Signal mit einem R_f-Wert von 0,85 entspricht dabei der eingesetzten radioaktiv markierten Substrataminosäure Isoleucin. Die Intensität dieses Signals nimmt zeitabhängig ab.

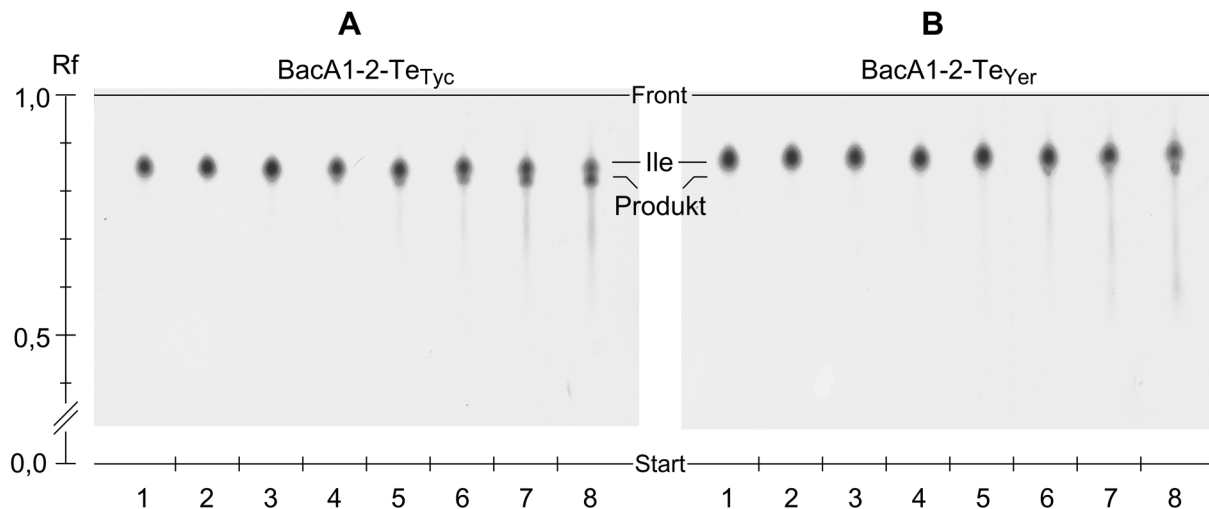


Abb. 6.5: Dünnschichtchromatographie. DC-Analyse der Enzyme BacA1-2-Te_{Tyc} (A) und BacA1-2-Te_{Yer} (B). Spur 1: Enzym inkubiert mit [¹⁴C]-Ile ohne Zugabe der zweiten Aminosäure Cystein. Spuren 2-8: Enzym inkubiert mit [¹⁴C]-Ile und nichtmarkiertem Cys nach Inkubationszeiten von 1, 3, 7, 15, 30, 60 und 90 min. Bei der Analyse des BacA1-2-Te_{Tyc} wurde die zeitabhängige Bildung eines Produktsignals beobachtet. BacA1-2-Te_{Yer} zeigt die Produktbildung nicht so deutlich.

Beim BacA1-2-Te_{Tyc} Konstrukt ist die Bildung des zweiten Signals (R_f: 0,81) deutlich ausgeprägter als beim BacA1-2-Te_{Yer}-Konstrukt. Im Gegensatz zum Isoleucin-Signal nimmt die Intensität des zweiten Signals mit der Zeit zu. Es wird nur gebildet, wenn neben [¹⁴C]-Ile auch nicht markiertes Cystein dem Reaktionsansatz zugesetzt wird. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass dieses einem Produkt aus beiden Substrataminosäuren zuzuordnen ist. Da jedoch keine Vergleichssubstanzen vorhanden waren, konnte anhand dieser Methode nicht aufgeklärt werden, ob es sich bei der entstehenden Verbindung tatsächlich um das erwartete Produkt Ile-Cys_{Thiazolin} handelte.

Ein Vergleich der DC-Analysen von BacA-2-Te_{Tyc} und BacA1-2-Te_{Yer} zeigte, dass BacA-2-Te_{Tyc} deutlich effizienter in der Bildung des bis dahin unbekannten Produktes ist als BacA1-2-Te_{Yer}. Für das dritte Hybridenzym, BacA-2-Te_{SrfC}, konnte unter gleichen Bedingungen keine Produktbildung nachgewiesen werden. Da ein effizientes System für weitere Untersuchungen entwickelt werden sollte, wurde ausschließlich mit dem BacA1-2-Te_{Tyc}-Konstrukt weitergearbeitet.

6.1.3.2 Produktanalyse mittels HPLC/MS

Mittels DC-Analyse konnte für das Enzym BacA-2-Te_{Tyc} in Anwesenheit der Substrate Isoleucin, Cystein und ATP die Bildung eines neuen Produktes nachgewiesen werden. Die Identifikation dieser Verbindung sollte anschließend mittels HPLC/MS-Analyse erfolgen. Dazu wurde das Enzym, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, mit Isoleucin, Cystein und ATP inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Reaktion direkt abgestoppt und analysiert. In Abhängigkeit der Substrate konnten im UV-Spektrum zwei deutliche Signale detektiert werden (14,3 und 17,2 min), deren Intensitäten zeitabhängig zunahmen (siehe Abb. 6.6).

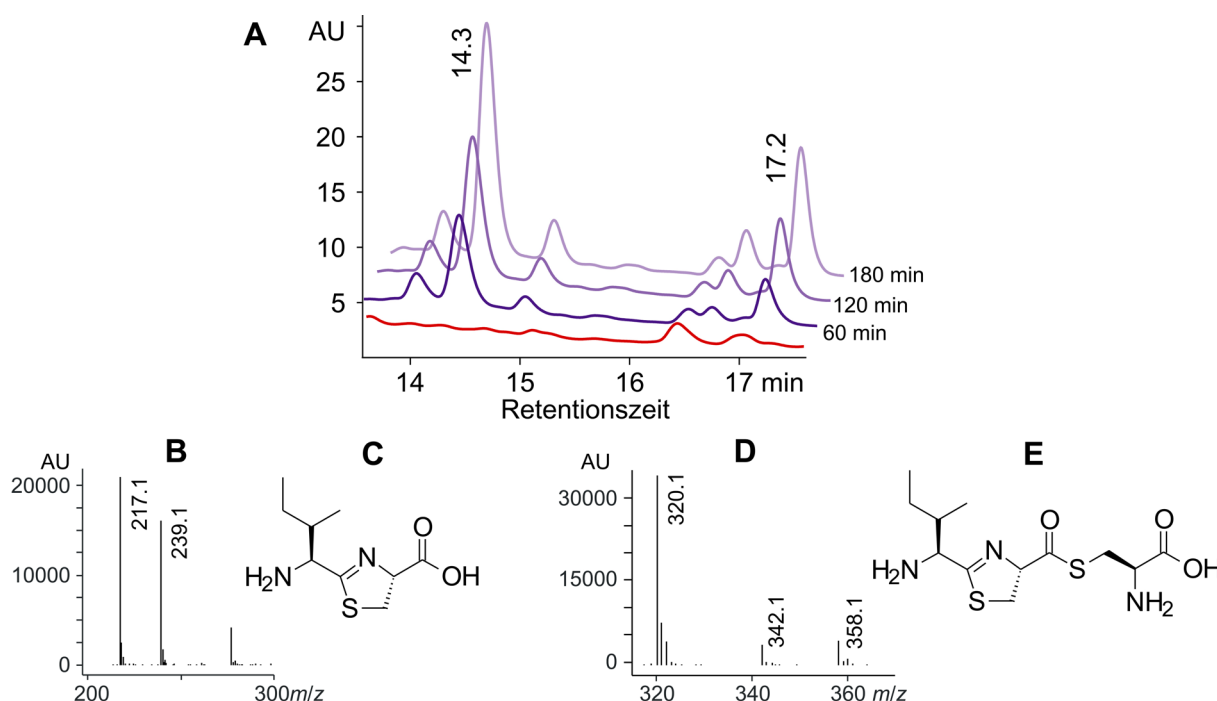


Abb. 6.6: HPLC/MS-Analyse des Hybridenzym BacA1-2-Te_{Tyc}. (A) Das HPLC-Chromatogramm zeigt die zeitabhängige Bildung zweier Hauptprodukte nach 60, 120 und 180 min. In rot die Analyse der Kontrollreaktion ohne ATP. Die Produkte bei 14,3 min und 17,2 min wurden durch ESI-MS-Analysen identifiziert. (B) Durch MS-Analyse konnte das Signal bei 14,3 min dem Ile-Cys_{Thiazolin}-Produkt (C) ($[M+H]^+ = 217$ m/z) zugeordnet werden. (D) Als Nebenprodukt wurde durch MS-Analyse das Signal bei 17,2 min als das Produkt Ile-Cys_{Thiazolin}-Cys (E) identifiziert ($[M+H]^+ = 320$ m/z).

Durch die gekoppelte ESI-MS-Analyse konnte dem Signal bei einer Retentionszeit von 14,3 min eine Masse von $[M+H]^+ = 217$ m/z zugeordnet werden ($[M+Na]^+ = 239$ m/z). Diese stimmte mit der berechneten Masse der heterozyklischen Verbindung Ile-Cys_{Thiazolin} überein ($[M+H]^+ = 217$ m/z; $[M+Na]^+ = 239$ m/z). Das zweite Signal bei 17,2 min entspricht einem Nebenprodukt mit der Masse $[M+H]^+ = 320$ m/z. Es konnte dem Produkt Isoleuciny-Thiazolinylcysteiny-Cystein (Ile-

Cys^{Thiazolin}-Cys) mit der berechnete Masse $[M+H]^+ = 320 \text{ m/z}$ ($[M+Na]^+ = 342 \text{ m/z}$) zugeordnet werden. Dieses Nebenprodukt entsteht wahrscheinlich aus einer nichtenzymatischen Transthioesterifizierung des enzymgebundenen Ile-Cys^{Thiazolin}-S-PP-Zwischenproduktes auf die Thiolgruppe eines freien Cysteins. Ähnliche Produkte wurden bei *in vitro*-Analysen anderer Systeme, wie zum Beispiel dem Yersiniabactin-Biosynthesesystem, bereits beschrieben [Miller & Walsh, 2001]. In Kontrollreaktionen ohne ATP oder einer der Substrataminosäuren konnte keine Produktsynthese nachgewiesen werden.

Zusammengefasst zeigt die dimodulare Hybridsynthetase BacA1-2-Te_{Tyc} ausgehend von den Substrataminosäuren Isoleucin und Cystein, die effektive Produktion des erwarteten Thiazolin-Ring enthaltenden Dipeptids Ile-Cys^{Thiazolin}. Diese artifizielle Peptidsynthetase stellt somit ein geeignetes Modellsystem für weitere Untersuchungen an der Cy-Domäne dar.

6.2 Die Cy-Domäne in Hybridenzymen

Nachdem anhand des BacA1-2-Te_{Tyc}-Modellsystems gezeigt werden konnte, dass die Cy-Domäne in hybriden, dimodularen Synthetasen funktional ist, sollte versucht werden, ob artifizielle Peptidsynthetasen durch Fusionen von Cy-Domänen oder Cy-Domänen enthaltenden Modulen konstruiert werden können. Auf diese Weise sollten Enzyme erhalten werden, die veränderte heterozyklische Dipeptide synthetisieren können.

6.2.1 Heterozyklisierung in der Myxothiazol- und Mycobactinbiosynthese

Für die Untersuchung von Domänen- und Modulfusionen mit der Cy-Domäne wurden neben dem beschriebenen Bacitracinoperon zwei weitere Biosyntheseoperons ausgewählt (siehe Abb. 6.7). Das Mycobactinsystem aus *Mycobacterium tuberculosis* katalysiert die Produktion des Mycobactins, welches einen aus Salicylat und Threonin/Serin gebildeten Oxazolin-Ring enthält. Hingegen sind im Myxothiazol, welches von speziellen *Stigmatella aurantiaca*-Stämmen produziert wird, zwei benachbarte Thiazol-Ringe zu finden.

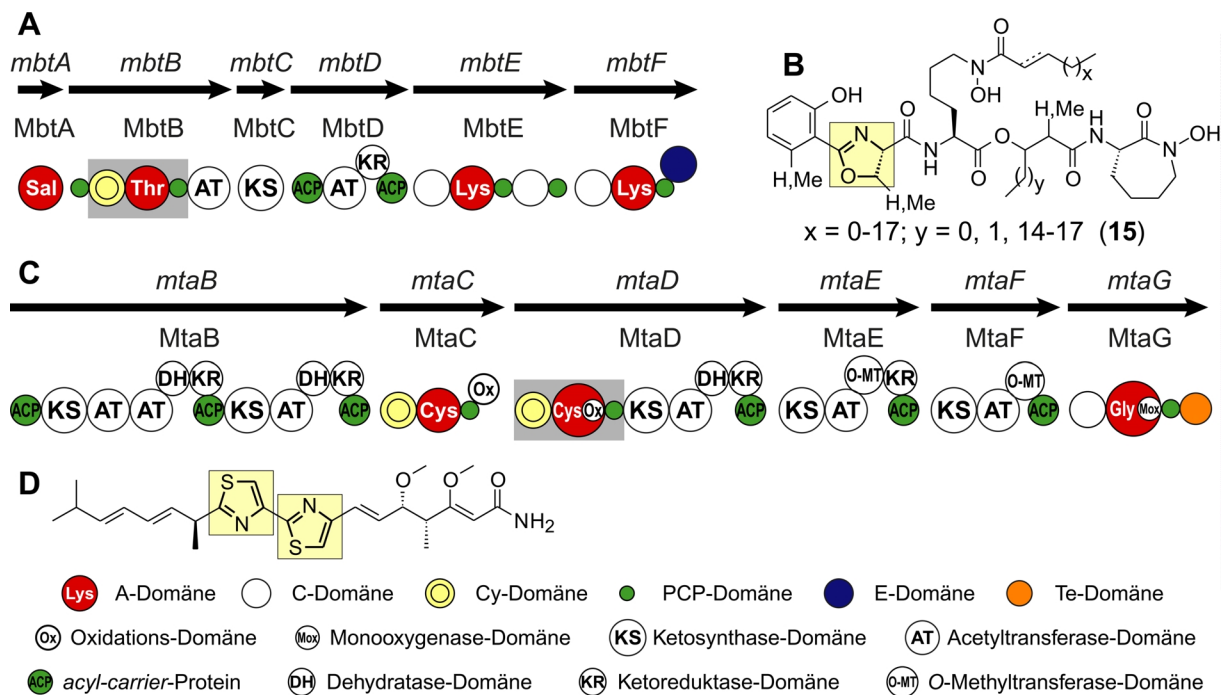


Abb. 6.7: Biosyntheseoperons des Mycobactins und Myxothiazols. (A) Sechs Gene, *mbtA-F*, codieren für die Enzyme MbtA-F des gemischten PKS/NRPS Mycobactin-Biosynthesesystems von *M. tuberculosis*. Die Cy-Domäne ist Teil der Synthetase MbtB. (B) Mycobactin enthält einen Oxazolinring, der aus Zyklisierung von Threonin/Serin-Seitenketten resultiert. (C) Sechs Gene, *mtaB-G*, codieren in *Stigmatella aurantiaca* für die Enzyme MtaB bis G des PKS/NRPS Myxothiazol-Systems. In MtaC und MtaD befinden sich die Cy-Domänen in Kombination mit Ox-Domänen (D) Myxothiazol enthält zwei Thiazol-Ringe, die aus der Oxidation von Thiazolin-Ringen resultieren. In der Konstruktion der Hybridsynthetasen verwendete Module sind grau unterlegt.

Sowohl Mycobactin als auch das Myxothiazol werden von gemischten NRPS/PKS-Systemen synthetisiert. Die Bildung des Oxazolin-Rings im Mycobactin wird durch eine Cy-Domäne katalysiert, die Bestandteil der Mycobactin-Synthetase B (MbtB) ist. Die A-Domäne des entsprechenden Moduls aktiviert Ser oder Thr, was zur Produktion verschiedener Mycobactin-Derivate führt. So sind Mycobactine mit Oxazolin-Ring, die durch Zyklisierung der Serin-Seitenkette entstehen, aber auch solche mit β -Methyl-Oxazolin-Ring aus der Zyklisierung der Threonin-Seitenkette bekannt. Der nichtribosomale Code der MbtB-A-Domäne lässt auf eine Thr-Selektivität schließen [Stachelhaus et al., 1999] (vgl. Kapitel 8.2), allerdings zeigen Thr-aktivierende A-Domänen auch in anderen Systemen hohe Selektivität für die chemisch verwandte Aminosäure Serin [Marshall et al., 2001].

Für die Bildung der Bisthiazol-Einheit des Myxothiazols sind zwei Module mit Cy-Domänen verantwortlich, die in den Myxothiazol-Synthetasen C und D (MtaC, MtaD) organisiert sind. In unmittelbarer Nachbarschaft zu den Cy-Domänen befinden sich Ox-Domänen, welche die Oxidation der gebildeten Thiazoline zu den entsprechenden Thiazol-Ringen katalysieren.

Während MtaC aus nur einem Modul mit der Domänenanordnung Cy-A-PCP-Ox besteht, ist MtaD eine Hybridsynthetase aus einem N-terminalen, vier Domänen umfassenden NRPS-Anteil mit einem Übergang zum C-terminalen PKS-Anteil. Die Position der Ox-Domäne ist auffällig, da sie eine Insertion innerhalb der A-Domäne darstellt. In diesem Fall ist die 285 Aminosäuren umfassende Ox-Domäne eingebettet zwischen den *core*-Motiven A8 und A9 der A-Domäne. Ähnliche Einschübe finden sich auch in A-Domänen von Epothilon- und Yersiniabactin-Synthetasen [Miller et al., 2002; Schneider et al., 2003]. Für Modulfusionen scheint das Cy-A(Ox)-PCP-Modul des MtaD besser geeignet, da durch die integrierte Ox-Domäne die Grenzen der übrigen Domänen unverändert sind.

6.2.2 Konstruktion hybrider dimodulare Peptidsynthetasen

Das BacA1-2-Te_{Tyc}-Konstrukt zeigte *in vitro* ausreichende Produktbildungsraten für das Dipeptid Ile-Cys_{Thiazolin}. Durch den Austausch von Domänen des zweiten Moduls (BacA2) innerhalb dieses Modellsystems gegen Domänen aus den Synthetasen MbtB und MtaD sollten Hybridsynthetasen konstruiert werden, die veränderte heterozyklische Verbindungen *in vitro* produzieren können. Während die resultierenden Bac-Mbt-Hybride in der Lage sein sollten, die heterozyklischen Dipeptide Isoleucinyloxazolinylthreonin (Ile-Thr_{Oxazolin}) und Isoleucinyloxazolinylserin (Ile-Ser_{Oxazolin}) zu synthetisieren, wurde erwartet, dass die Bac-Mta-Hybride durch Oxidation des gebildeten Heterozyklus das Dipeptid Isoleucinylthiazolylcystein (Ile-Cys_{Thiazol}) produzieren.

Da eine ähnliche Substratselektivität, wie sie für C-Domänen beobachtet wurde (vgl. Kapitel 2.3.1), für Cy-Domänen nicht ausgeschlossen werden konnte, sollten verschiedene Fusionsstrategien untersucht werden. Zum einen wurde darauf geachtet, dass die native Verbindung von Cy- und A-Domänen erhalten blieb, um eventuelle Probleme einer der C-Domäne vergleichbaren Selektivität vorzubeugen. Zum anderen wurde die Fusionsstelle jedoch bewusst zwischen Cy- und A-Domäne positioniert, um die Möglichkeit der Umsetzung von nicht-kognaten Substraten durch die Cy-Domäne zu untersuchen.

Durch Fusion des Initiationsmoduls BacA1 ([A-PCP]_{BacA1}) bzw. des Initiationsmoduls inklusive der Cy-Domäne ([A-PCP-Cy]_{BacA1-2}) mit den entsprechenden Domänen der MbtB-Synthetase entstanden die Konstrukte

Bac-Mbt-I mit den Domänenorganisationen $[A-PCP]_{BacA1}-[Cy-A-PCP]_{MbtB}-[Te]_{TycC6}$ und Bac-Mbt-II ($[A-PCP-Cy]_{BacA1-2}-[Cy-A-PCP]_{MbtB}-[Te]_{TycC6}$). Die gleiche Strategie liegt der Konstruktion der Hybride Bac-Mta-I ($[A-PCP]_{BacA1}-[Cy-A-PCP]_{MtaD}-[Te]_{TycC6}$) und Bac-Mta-II ($[A-PCP-Cy]_{BacA1-2}-[A-PCP]_{MtaD}-[Te]_{TycC6}$) unter Verwendung der MtaD-Domänen zugrunde (native Domänensequenzen sind durch eckige Klammern, Fusionsstellen durch Bindestriche zwischen den Klammern gekennzeichnet; Indizes geben den Ursprung der Domänen an) (siehe Abb. 6.8).

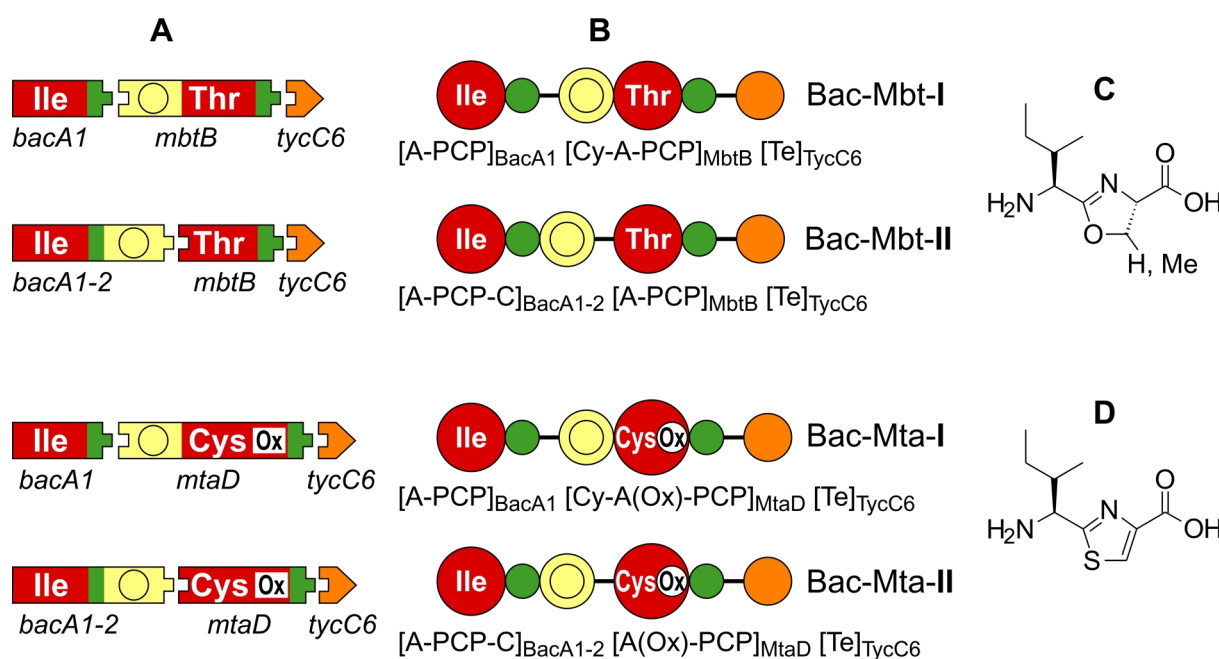


Abb. 6.8: Dimodulare Hybridenzyme. (A) Die Gene der Hybridenzyme wurden durch Kombination der entsprechenden DNA-Fragmente zusammengestellt. (B) Die Fusionsstellen wurden in den Interdomänen-Linkern positioniert. In der Konstruktbeschreibung sind natürlich zusammengehörige Domänen durch eckigen Klammern gekennzeichnet. Die Indizes geben den Ursprung der Domänen an. Die Hybridenzyme wurden als Bac-Mbt-I u.-II und Bac-Mta-I u.-II bezeichnet. (C) Die erwarteten Produkte der Bac-Mbt-Konstrukte sind Ile-Ser_{Oxazolin} und Ile-Thr_{Oxazolin}. (D) Die Bac-Mta-Enzyme sollten Ile-Cys_{Thiazol} produzieren.

Die Konstruktion der Hybride erfolgte auf DNA-Ebene durch Kombination der entsprechenden, mittels PCR amplifizierten Genfragmente. Bezogen auf die Aminosäuresequenz wurden die Fusionsstellen innerhalb der Interdomänen-Linker zwischen PCP- und Cy-Domäne 38 AS stromabwärts des invarianten Serins des PCP und 21 AS (Bac-Mbt-I) bzw. 23 AS (Bac-Mta-I) stromaufwärts vom *core*-Motiv Cy1 der Cy-Domäne lokalisiert. Die Fusionen zwischen Cy- und A-Domänen wurden 26 AS stromabwärts des *core*-Motivs Cy7 und 60 AS vor dem *core*-Motiv A1 im Linkerbereich zwischen Cy- und A-Domäne durchgeführt. Die Fusion der Te-Domäne

erfolgte, wie schon für das BacA1-2-Te-System beschrieben, 38 AS stromabwärts des Serins der zweiten PCP-Domäne.

Die Überproduktion der dimodularen Synthetasen erfolgte in *E. coli* BL21/pRep4[*gsp*]-Zellen unter Verwendung der auf pQE60 basierenden Expressionsvektoren *pbac-mbt-1* und *pbac-mbt-2* bzw. *pbac-mta-1* und *pbac-mta-2* (Konstruktion siehe Kapitel 4.1.1.2). Die resultierenden rekombinanten Proteine konnten in löslicher Form erhalten, mittels Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigt und anschließend biochemisch analysiert werden.

6.2.3 Biochemische Charakterisierung

Wie bereits für das Modellsystem beschrieben, wurden zunächst die katalytischen Einzelaktivitäten der Bac-Mbt- und Bac-Mta-Synthetasen, in Bezug auf Adenylierungs- und Beladungsreaktion, untersucht.

6.2.3.1 ATP-PP_i-Austauschreaktion

Bei der Untersuchung der Bac-Mbt-Konstrukte bestätigte die ATP-PP_i-Austauschreaktion die erwartete Aktivität der A-Domänen (siehe Abb. 6.9). Das Hybrid Bac-Mbt-I zeigte die höchste Selektivität für Ile (100%) und Thr (95%). Aufgrund der beschriebenen Nebenselektivitäten konnte auch die Aktivierung von Ser beobachtet werden (51%).

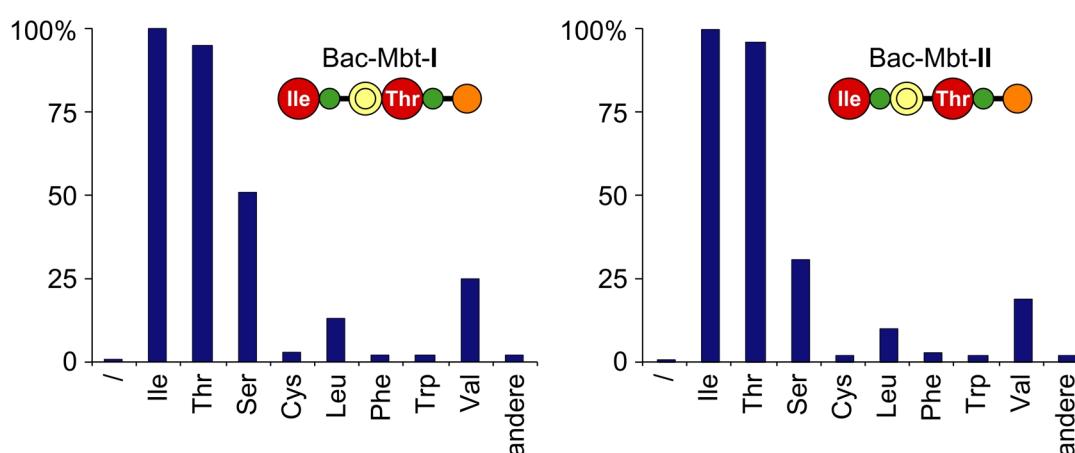


Abb. 6.9: ATP-PP_i-Austauschraten der Bac-Mbt-Hybridenzyme. Die Bac-Mbt-Hybride zeigen deutliche Selektivität für Ile, Thr und Ser.

Weitere Nebenaktivitäten wurden für Val (25%), Leu (13%) und Cys (3%) gefunden. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Analyse des Konstrukts Bac-Mbt-II erhalten werden (Ile 100%, Thr 96%, Ser 31%, Val 19%, Leu 10 %, Cys 2%).

Ein unerwartetes Ergebnis erbrachte die ATP-PP_i-Austauschreaktion der Bac-Mta-Konstrukte (siehe Abb. 6.10). Von der MtaD-A-Domäne wurde angenommen, dass sie eine Selektivität für Cystein besitzt, da der Myxothiazol-Produzentenstamm ausschließlich das Produkt mit Thiazol-Ringen synthetisiert. Außerdem entspricht der nichtribosomale Code der MtaD-A-Domäne dem von Cys-aktivierenden A-Domänen [Stachelhaus et al., 1999] (vgl. Kapitel 8.2). Trotzdem aktivierten beide Bac-Mta-Hybride neben Ile (je 100%) selektiv Thr (Bac-Mta-I: 91%; Bac-Mta-II: 87%) und mit relativ hoher Effizienz auch Ser (40% bzw. 31%). Cystein wurde allerdings nur mit geringer Selektivität aktiviert (8% bzw. 5%). Andere Nebenselektivitäten wurden für Val (31%; 24%), Phe (12%, 12%), und Leu (7%; 8%) gefunden.

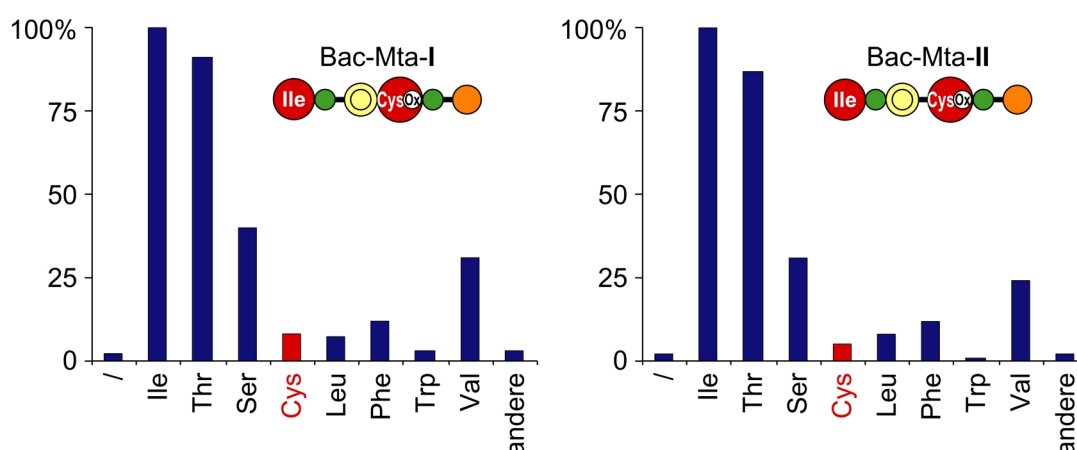


Abb. 6.10: ATP-PP_i-Austauschraten der Bac-Mta-Hybridenzyme. Die Bac-Mta-Konstrukte zeigen ebenfalls Selektivität für Ile, Thr und Ser. Die erwartete Aktivierung von Cys (rot markiert) fiel nur sehr gering aus (Bac-Mta-I: 8%, Bac-Mta-II: 5%).

6.2.3.2 Beladungsreaktion

Die Analyse der Beladungsreaktion erfolgte wie in Kapitel 4.2.6.2 beschrieben unter Verwendung der radioaktiv markierten Aminosäuren Isoleucin und Threonin. Durch die Untersuchung der Beladungsaktivitäten konnten die Ergebnisse der ATP-PP_i-Austauschreaktion in Bezug auf die ermittelten Substrataminosäuren bestätigt werden. Sowohl die Bac-Mbt- als auch die Bac-Mta-Konstrukte waren in der Lage, die aktivierten Aminosäuren kovalent zu binden, wie durch die Inkorporation

von markiertem [^{14}C]-Ile und [^{14}C]-Thr oder [^3H]-Thr gezeigt werden konnte (siehe Abb. 6.11).

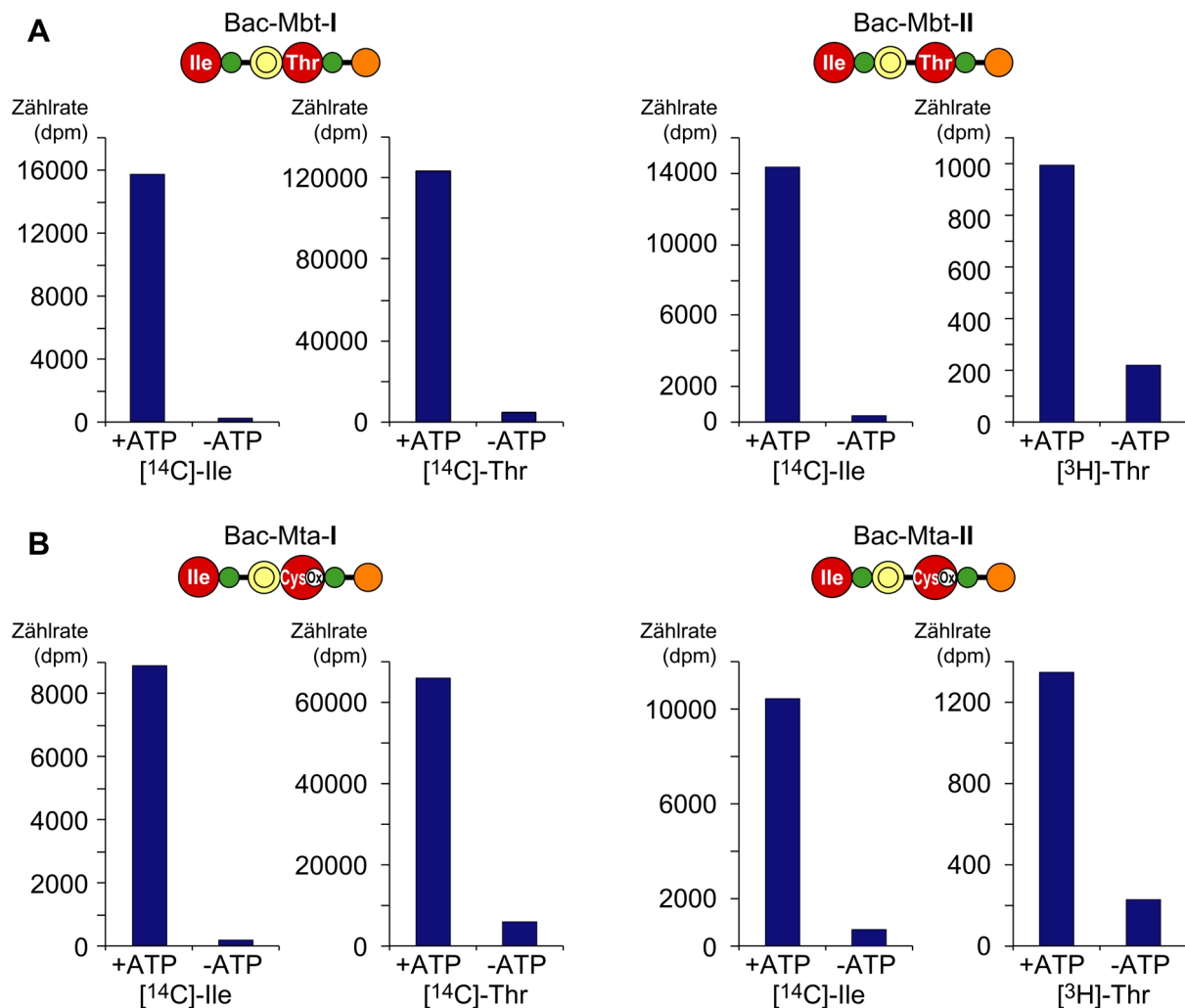


Abb. 6.11: Beladungsreaktionen der Bac-Mbt und Bac-Mta-Hybridenzyme. (A) Die Beladungsreaktion der Bac-Mbt-Enzyme zeigt die kovalente Bindung der im ATP-PP_i-Austausch aktivsten Aminosäuren. (B) Auch die Bac-Mta-Konstrukte zeigen die kovalente Bindung der am höchsten aktivierten Aminosäuren Ile und Thr. Gezeigt sind jeweils die Zählraten nach Inkubation der Enzyme mit ATP und markierter Aminosäure (+ATP). Als Kontrollreaktion dienten identische Ansätze ohne ATP (-ATP).

6.2.4 Produktbildung

Die Analysen der Einzelaktivitäten der A- und PCP-Domänen zeigten die Funktionalität aller Fusionsproteine bezüglich Adenylierung und Thiolierung, auch wenn im Fall der Bac-Mta-Konstrukte unerwartete Selektivitäten der zweiten A-Domäne beobachtet wurden. Im Folgenden sollte nun die Produktbildungsaktivität der Hybridenzyme untersucht werden. Dazu wurden gekoppelte HPLC/MS-Analysen

äquivalent zur Untersuchung der BacA1-2-Te-Enzyme durchgeführt (vgl. Kapitel 4.3.2).

6.2.4.1 Produktanalyse der Bac-Mbt-Hybridenzyme

Durch Inkubation des Hybridenzym *Bac-Mbt-I* mit ATP und den Substrataminosäuren Isoleucin und Threonin konnte mittels der HPLC/MS-Analyse die Bildung des erwarteten Produktes Ile-Thr_{Oxazolin} (bei 9.7 min, $[M+H]^+ = 215$ m/z, berechnete Masse: 215 m/z) nachgewiesen werden (siehe Abb. 6.12). Wenn neben ATP und Isoleucin die Substrataminosäure Serin eingesetzt wird, ist *Bac-Mbt-I* in der Lage, auch die heterozyklische Verbindung (Ile-Ser_{Oxazolin}) zu synthetisieren (bei 12.3 min, $[M+H]^+ = 201$ m/z, berechnete Masse: 201 m/z).

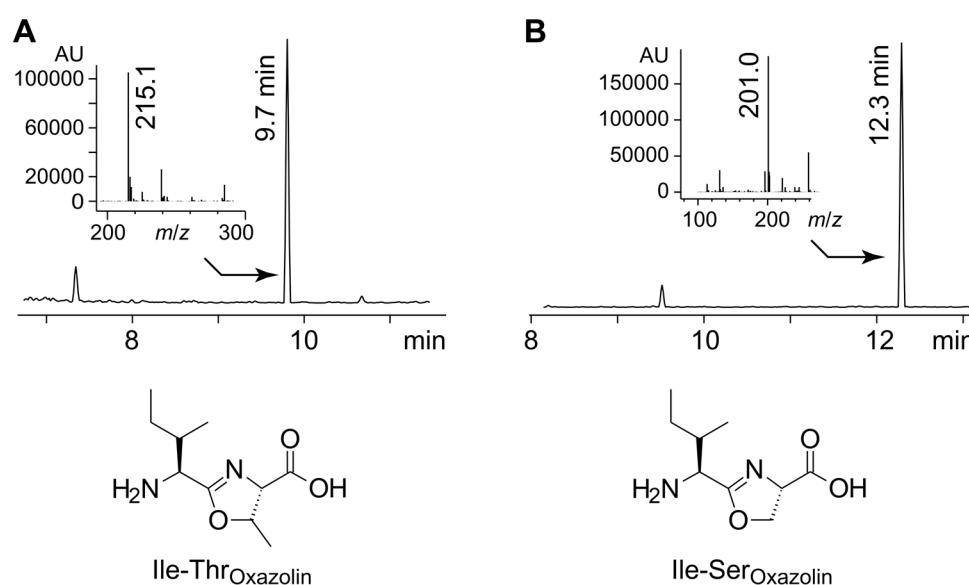


Abb. 6.12: HPLC/MS-Analyse des Konstrukts Bac-Mbt-I. (A) In Gegenwart von Isoleucin und Threonin wird das Produkt Ile-Thr_{Oxazolin} gebildet. Das Massenspektrum zeigt das entsprechende Signal der Masse $[M+H]^+ = 215$ m/z. (B) Inkubation mit Isoleucin und Serin führt zur Produktion des Ile-Ser_{Oxazolin}, welches durch Analyse der Masse identifiziert werden konnte ($[M+H]^+ = 201$ m/z).

Im Vergleich zum Modellsystem BacA1-2-Te_{Tyc} musste jedoch für die *Bac-Mbt-I*-Synthetase eine 80fache Reduzierung der Produktbildungsrate beobachtet werden.

Das zweite *Bac-Mbt*-Konstrukt (*Bac-Mbt-II*), in dem die Module zwischen Cy- und A-Domäne fusioniert wurden, zeigte unter gleichen Bedingungen keine Produktbildung. Obwohl die Bestimmung der Aktivität der A-Domänen und die Beladungsreaktion zum *Bac-Mbt-I* vergleichbare Ergebnisse zeigte (vgl. Kapitel

6.2.3), scheint diese Synthetase in der gegebenen Domänenzusammensetzung nicht befähigt zu sein, ein Produkt zu bilden.

6.2.4.2 Produktanalyse der Bac-Mta-Hybridenzyme

Wurde die Hybridsynthetase Bac-Mta-I mit ATP, Isoleucin und Threonin inkubiert, konnte die Bildung des Produktes Isoleucinyloxazolinylthreonin (Ile-Thr_{Oxazol}) detektiert werden (9.6 min, $[M+H]^+ = 213$ m/z, berechnete Masse: $[M+H]^+ = 213$ m/z) (siehe Abb. 6.13). Es musste jedoch eine ähnlich verringerte Aktivität der Produktbildung wie beim Bac-Mbt-I gegenüber dem Modellsystem festgestellt werden.

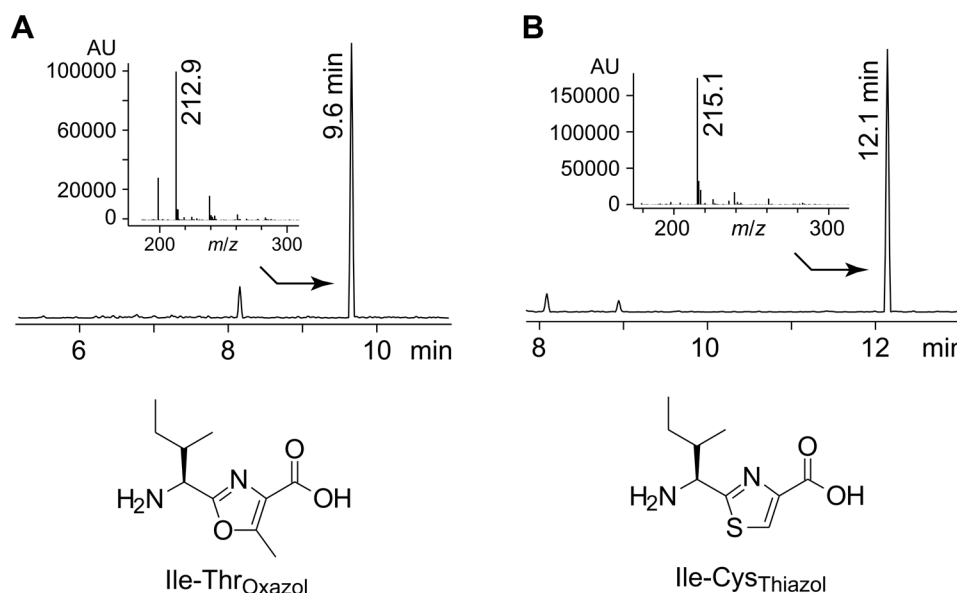


Abb. 6.13: HPLC/MS-Analyse des Konstrukts Bac-Mta-I. (A) In Gegenwart von Isoleucin und Threonin wird das Produkt Ile-Thr_{Oxazol} gebildet ($[M+H]^+ = 215$ m/z). (B) In Gegenwart von Isoleucin und Cystein wird ein Produkt gebildet, welches durch das zugehörige Massenspektrum als Ile-Cys_{Thiazol} identifiziert werden konnte ($[M+H]^+ = 201$ m/z).

Bei Verwendung von Serin anstelle Threonin als Substrat zeigte das Hybridenzym Bac-Mta-I unter gleichen Bedingungen trotz der deutlichen Aktivierung von Serin in der ATP-PP_i-Austauschreaktion keine Produktbildung.

Obwohl die ATP-PP_i-Austauschreaktion nur geringe Selektivität zeigte, wurde auch Cystein als Substratamino-säure in der Produktanalyse untersucht. Dabei wurde trotz der geringen Aktivierung durch die MtaD-A-Domäne (8%) ein Produkt gebildet, welches als Isoleucinyloxazolinylcystein (Ile-Cys_{Thiazol}) identifiziert werden konnte (12.1 min, $[M+H]^+ = 215$ m/z, berechnete Masse: 215 m/z) (siehe Abb. 6.13).

Durch Analyse des zweiten Bac-Mta-Konstrukts (Bac-Mta-II) konnte, wie beim identisch konstruierten Bac-Mbt-II, keine Dipeptidbildung nachweisen werden, obwohl auch hier die Aktivität der A-Domänen und die Beladung der PCP-Domänen mit den Substrataminosäuren gezeigt werden konnte.

Die Untersuchung der Hybridenzyme zeigt die Möglichkeit der Domänenfusion zur Konstruktion neuer Synthetasen, die Cy-Domänen enthalten. Es war möglich, durch Kombination des BacA1-Initiationsmoduls mit Cy-A-PCP-Modulen anderer Systeme aktive Enzyme zu erhalten. Zudem konnte gezeigt werden, dass die natürliche Verbindung von Cy- und nachfolgender A-Domäne erhalten werden muss, um aktive Enzyme aufzubauen. Durch Fusionen zwischen Cy- und A-Domäne entstandene Hybridenzyme (Bac-Mbt-II, Bac-Mta-II) waren in der Produktbildung inaktiv. Möglicherweise ist dieses Ergebnis ein Hinweis auf eine Substratselektivität der Cy-Domäne, wie sie für C-Domänen beschrieben wurde (vgl. Kapitel 2.3.1).

Zusätzlich konnte anhand der Bac-Mta-I-Synthetase gezeigt werden, dass auch die Ox-Domäne in artifiziellen NRPS aktiv ist.

6.3 Mutationsanalyse der Cy-Domäne

Der genaue Mechanismus der Heterozyklisierung während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese ist nach wie vor nicht aufgeklärt. Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, wird angenommen, dass insgesamt drei unabhängige Reaktionen von der Cy-Domäne katalysiert werden. Der erste Schritt ist danach die Verknüpfung der Substrate, gefolgt von der Bildung des fünfgliedrigen Rings und einer abschließenden Dehydratisierung zum entsprechenden Thiazolin- oder Oxazolin-Ring (Abb. 2.10).

Zu Beginn dieser Arbeit gab es Hinweise darauf, dass Kondensation und Heterozyklisierung unabhängig voneinander ablaufen. Auch wurde angenommen, dass im ersten Schritt eine Peptidbindung geknüpft wird, bevor die Kondensation der Seitenkette zum Heterozyklus erfolgt [Marshall et al., 2001].

Mit dem in Kapitel 6.1 beschriebenen Modellsystem BacA1-2-Te_{Tyc} stand nun eine Synthetase zur Verfügung, die *in vitro* eine ausreichend hohe Umsatzrate liefert, um durch Mutationsanalyse eine genauere Untersuchung der Reaktionsabfolge in der Katalyse der Cy-Domäne durchzuführen.

6.3.1 Strategie der Mutationsanalyse und Herstellung der Mutanten

Das gut untersuchte Biosynthesesystem des Vibriobactin aus *Vibrio cholerae* (siehe Abb. 6.14) wurde bei der Planung zur Mutationsanalyse der Cy-Domäne herangezogen.

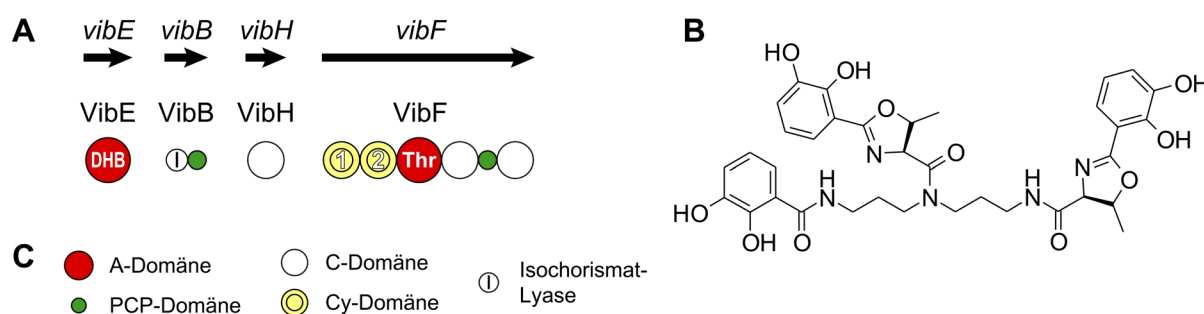


Abb. 6.14: Das Vibriobactin-Biosynthesesystem. (A) Vier Gene, *vibEBHF*, codieren in *Vibrio cholerae* für die Synthetasen VibEBHF. Besonderheiten sind die freistehende C-Domäne VibH und die Anordnung der Cy-Domänen Cy1 und Cy2 in VibF. (B) Durch Verbindung von Dihydroxybenzoat mit Threonin entstehen im Vibriobactin zwei Oxazolin-Ringe. (C) Bezeichnungen der Domänen.

Die Synthetase VibF besitzt die ungewöhnliche Domänenabfolge Cy-Cy-A-C-PCP-C, wobei der N-Terminus des VibF von zwei aufeinander folgenden Cy-Domänen gebildet wird. Diese ungewöhnliche Domänenanordnung gab Anlass zu der Vermutung, dass zumindest eine dieser Tandem-Cy-Domänen in ihrer Aktivität beeinträchtigt ist. Anhand von Mutationsanalysen der VibF-Cy-Domänen konnte gezeigt werden, dass die zweite Cy-Domäne des VibF (VibF-Cy2), obwohl sie hohe Homologien zu anderen Cy-Domänen aufweist, lediglich die Verknüpfung der Substrate 2,3-Dihydroxybenzoat und Threonin, nicht aber die Zyklisierung der Seitenkette katalysiert [Marshall et al., 2002]. Die Bildung der Oxazolin-Ringe im Vibriobactin erfolgt hingegen unter der Katalyse der ersten Cy-Domäne (VibF-Cy1), die ihrerseits, wie andere Cy-Domänen, sowohl die Kondensations- als auch die Zyklisierungsreaktion katalysieren kann.

Außerdem ergaben die Untersuchungen des Vib-Systems, dass das hochkonservierte Motiv DxxxxD, welches zwischen den *core*-Motiven Cy2 und Cy3 lokalisiert ist, dem katalytisch aktiven *core*-Motiv C3 der C-Domäne (HHxxxDG) entspricht und ebenfalls in die Katalyse der Kondensationsreaktion involviert ist [Bergendahl et al., 2002; Keating et al., 2002; Marshall et al., 2002]. Aufgrund dieser Verwandtschaft, wird dieses Motiv in der Cy-Domäne auch als *core*-C3' bezeichnet (*core*-Motive im Anhang 8.1).

Anhand der Kristallstruktur der freistehenden C-Domäne VibH konnte die räumliche Anordnung dieses wichtigen Sequenzmotivs determiniert werden [Keating et al., 2002]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das C3-Motiv der C-Domäne, das sich im N-terminalen Bereich befindet, im Solventkanal lokalisiert ist (vgl. Kapitel 2.3.1.3). Diese Erkenntnisse und die strukturelle Ähnlichkeit zwischen C- und Cy-Domänen - aufgrund von Sequenzvergleichen wird eine der VibH-C-Domäne ähnliche Struktur für Cy-Domänen vorhergesagt - legen die Vermutung nahe, dass sich im N-terminalen Teil der Cy-Domäne ebenfalls das aktive Zentrum für die Substrat-Kondensation befindet.

Durch den Sequenzvergleich verschiedener Cy-Domänen mit der in der Zyklisierung inaktiven VibF-Cy2 konnten mehrere Reste determiniert werden, die in allen Cy-Domänen - ausgenommen VibF-Cy2 - konserviert sind. Diese Unterschiede treten verstärkt in der C-terminalen Hälfte der Cy-Domäne auf. Möglicherweise beruht die Inaktivität bezüglich der Zyklisierung auf der Veränderung dieser Reste. Die Tatsache, dass Vib-Cy2 aber die Fähigkeit besitzt, die Kondensationsreaktion zu katalysieren, spricht für die Unabhängigkeit von Kondensation und Zyklisierung. Die Veränderungen innerhalb des C-Terminus unterstützen diese Annahme, da sie zusätzlich für eine räumliche Trennung der beiden Teilreaktionen sprechen.

Abbildung 6.15 zeigt einen Sequenzvergleich von sieben Cy-Domänen (Position 621-1061; Nummerierung bezogen auf die Aminosäuresequenz von BacA). Die auffälligsten Unterschiede zwischen VibF-Cy2 und anderen Cy-Domänen finden sich zwischen den *core*-Motiven Cy4 und Cy6. Innerhalb dieses Bereichs finden sich neun invariante Reste, die in VibF-Cy2 und den anderen Cy-Domänen konserviert sind. Zusätzlich finden sich hier neun Positionen, die innerhalb der Cy-Domänen konserviert sind, ausgenommen VibF-Cy2. Unter diesen fanden an drei Positionen (904, 932 und 982) lediglich konservative Substitutionen zwischen verschiedenen hydrophoben Aminosäuren statt.

Daher wurden nur die übrigen sechs Reste (T875, N900, R906, D919, F920 und S984), die deutliche Veränderungen in den Seitenketten aufweisen, für Mutationsanalysen am BacA1-2-Te_{Tyc}-Konstrukt ausgewählt.

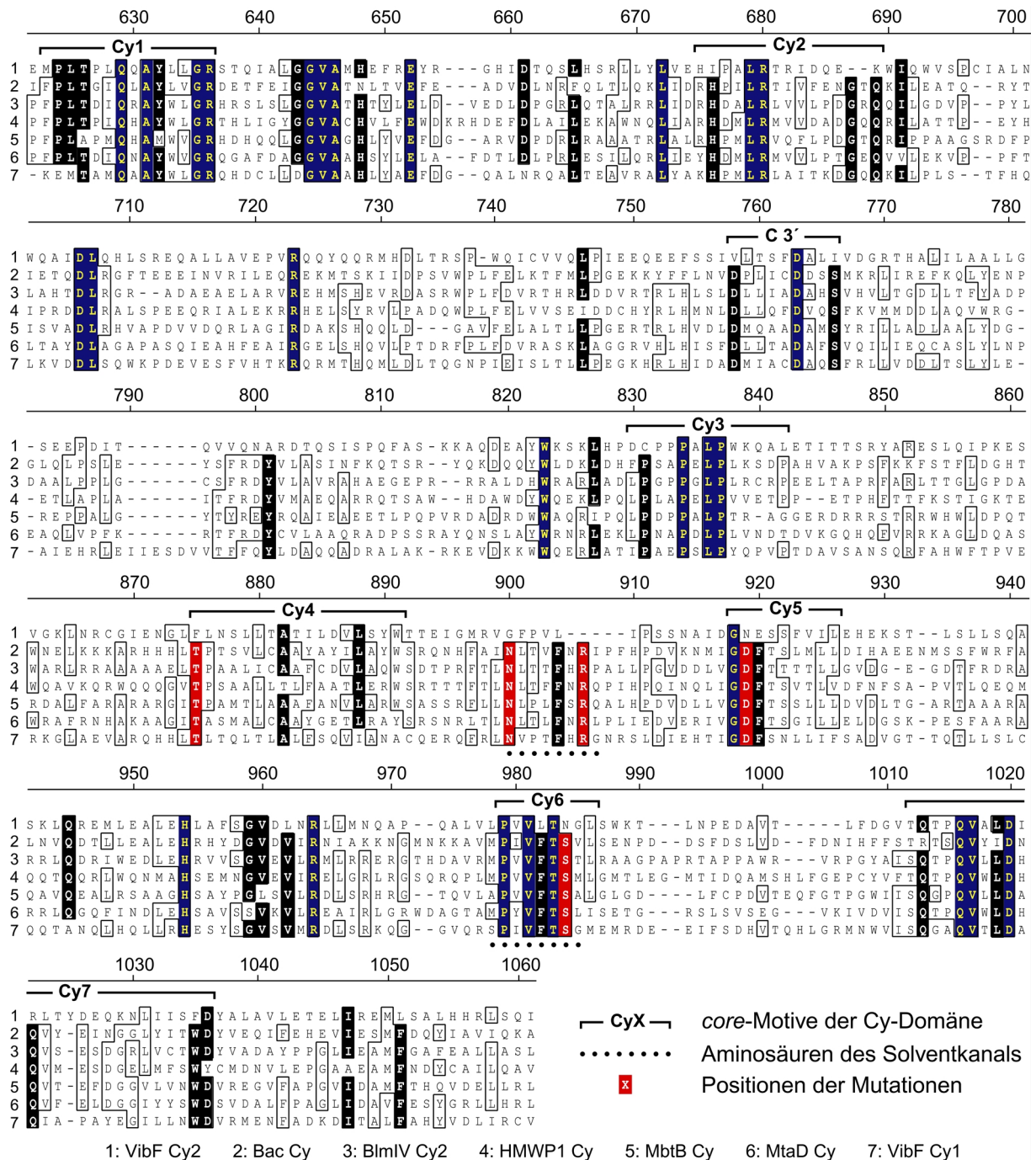


Abb. 6.15: Sequenzvergleich von Cy-Domänen. Gezeigt sind die Cy-Domänen aus folgenden Synthetasen: VibF aus dem Vibriobactin-System (*V. cholerae*), BacA2 (Bacitracin-System, *B. subtilis*), HMWP1 (Yersiniabactin-System, *Y. pestis*), MbtB (Mycobactin-System, *M. tuberculosis*), MtaD (Myxothiazol-System, *S. aurantiaca*) und BlmIV (Bleomycin-System, *S. verticillus*). Invariante Reste sind blau, Reste, die in mindestens sechs Domänen konserviert sind, schwarz unterlegt. In mindestens vier Domänen vorhandene Reste sind durch Kästen gekennzeichnet. Die core-Motive sind markiert und entsprechend beschriftet. Reste des putativen Solventkanals sind durch Punkte gekennzeichnet. Positionen, die durch Mutationsanalyse untersucht wurden, sind rot markiert.

Durch ortsgerichtete Mutagenese (vgl. Kapitel 4.1.1.2) wurden im BacA1-2- Te_{Tyc} -Modellsystem die genannten Aminosäuren einzeln gegen Alanine ausgetauscht, wodurch die mutierten Hybridenzyme BacA1-2- TeT875A ,

BacA1-2-Te**N900A**, BacA1-2-Te**R906A**, BacA1-2-Te**D919A** und BacA1-2-Te**S984A** erhalten wurden. Aus unbekannten Gründen konnte die Mutante BacA1-2-Te**F920A** nicht hergestellt werden. Die fünf resultierenden Mutanten wurden heterolog in *E. coli* BL21/pRep4[*gsp*]-Zellen überproduziert und mittels Ni^{2+} -IMAC gereinigt.

6.3.2 Biochemische Charakterisierung

Die Mutationen innerhalb der Cy-Domäne sollten die Funktionalität der Substrat erkennenden und aktivierenden A-Domänen sowie deren Interaktion mit den PCP-Domänen nicht beeinflussen. Tatsächlich zeigten die fünf vermessenen Mutanten keine Unterschiede in der ATP-PP_i-Austauschreaktion und in der Untersuchung zur Beladungsreaktion, verglichen zum Ausgangskonstrukt BacA1-2-Te_{Tyc} (vgl. Kapitel 6.1.2, Daten nicht gezeigt). Es kann also davon ausgegangen werden, dass durch die Veränderungen innerhalb der Cy-Domäne die Einzelaktivitäten der Adenylierung und Thiolierung nicht verändert wurden.

6.3.3 Produktbildung

Durch die Analyse der Produktbildung sollte der Einfluss der Aminosäuren an den Positionen 875, 900, 906, 919, und 984 innerhalb der Cy-Domäne auf die Katalyse der Kondensation sowie der Heterozyklisierung untersucht werden. Sollten die ausgewählten Reste nur an Katalyse der Zyklisierung beteiligt sein, so ist von den mutierten BacA1-2-Te_{Tyc}-Konstrukten die Produktion des linearen Produktes IsoleucinyI-Cystein (Ile-Cys) zu erwarten. Je nachdem, wie die Kondensation der Substrate erfolgt, wird die Bildung einer Peptidbindung oder eines Thioesters erwartet (vgl. Kapitel 2.3.3). Mutanten, die in der Katalyse der Kondensationsreaktion beeinflusst sind, sollten kein Produkt bilden können.

Durch HPLC/MS-Analyse wurde, wie unter Kapitel 4.3.2 beschrieben, die Produktbildung der Cy-Domänen-Mutanten untersucht, indem sie mit ATP, Isoleucin und Cystein inkubiert wurden. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse können die fünf Mutanten in drei Kategorien eingeteilt werden:

Die Mutanten BacA1-2-Te**T875A** und BacA1-2-Te**R906A** sind inaktiv in der Produktbildung. Weder des heterozyklische Ile-Cys_{Thiazolin} noch das lineare Dipeptid Ile-Cys konnten nachgewiesen werden. Bei diesen Synthetasen findet also schon die Verknüpfung der Substrataminosäuren nicht statt.

Unveränderte Funktionalität im Vergleich zum Ausgangskonstrukt zeigt die Mutante BacA1-2-Te**D919A**. Dieses Enzym produziert beide, vom Modellsystem bekannten Thiazolin-Produkte Ile-Cys_{Thiazolin} (bei 14.1 min, $[M+H]^+ = 217$ m/z, berechnete Masse 217 m/z) und Ile-Cys_{Thiazolin}-Cys (bei 17.1 min, $[M+H]^+ = 320$ m/z, berechnete Masse 320 m/z).

Die dritte Kategorie bilden die Mutanten BacA1-2-Te**N900A** und BacA1-2-Te**S984A**. Die HPLC/MS-Analyse bestätigte die Produktion des erwarteten linearen Dipeptides Ile-Cys bei 12.8 min mit einem $[M+H]^+$ -Signal von 235 m/z, was der berechneten Masse für Ile-Cys entspricht. Zusätzlich konnte die Bildung des dimeren Produktes (Ile-Cys)₂ nachgewiesen werden (21.2 min, $[M+H]^+ = 467$ m/z, berechnet $[M+H]^+ = 467$ m/z) (siehe Abb. 6.16). Dieses Dimer entsteht bei der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den freien Thiolgruppen der Cystein-Seitenketten zweier Ile-Cys-Dipeptide und bestätigt somit die durch die Cy-Domäne katalysierte Bildung der Peptidbindung.

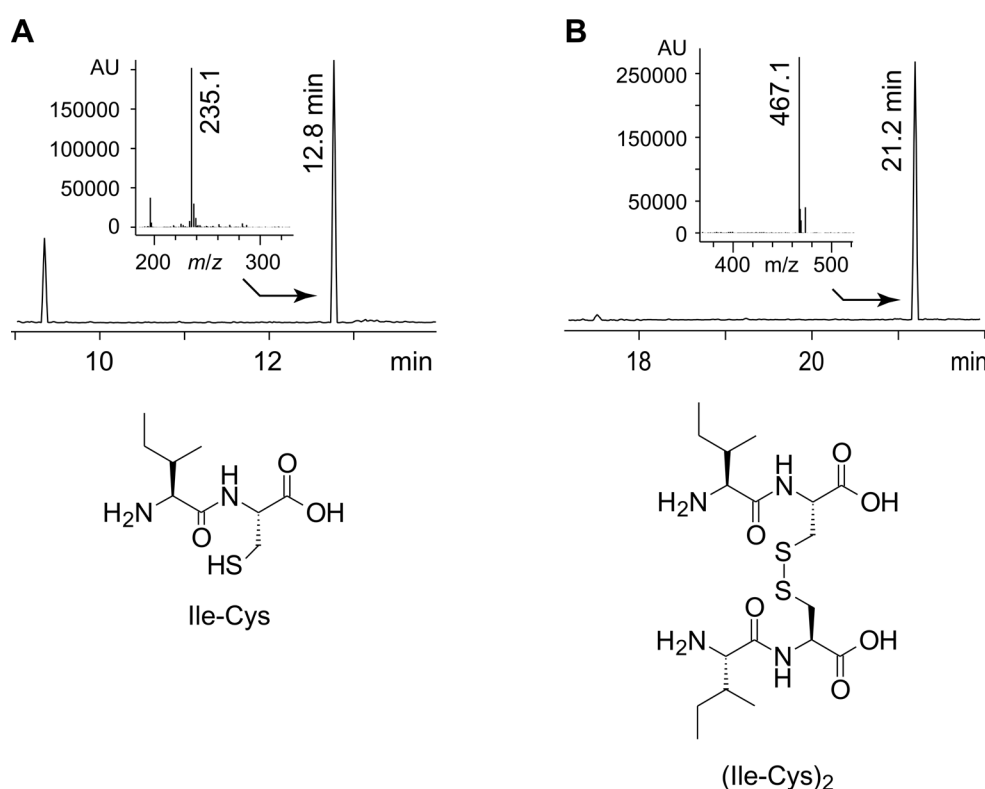


Abb. 6.16: Produktanalyse der Mutante BacA1-2-Te(N900A). (A) In Gegenwart von Isoleucin und Cystein wird das, anhand des Massenspektrums identifizierte, lineare Dipeptid Ile-Cys gebildet (12,8 min, $[M+H]^+ = 235$ m/z). (B) Als Nebenprodukt entsteht durch Bildung einer Disulfidbrücke das Dimer (Ile-Cys)₂ (21,2 min $[M+H]^+ = 467$ m/z).

Beide Mutanten, BacA1-2-Te**N900A** und BacA1-2-Te**S984A**, waren also lediglich in der Katalyse der Heterozyklisierung beeinträchtigt. Der Nachweis des linearen Dipeptides zeigt, dass die Kondensation aber stattfindet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Mutationsanalyse Einblicke in die Reaktionsabfolge der Cy-Domäne ermöglicht wurden. Der Nachweis des linearen Produktes bei der Analyse der Mutanten BacA1-2-Te**N900A** und BacA1-2-Te**S984A** beweist die unabhängige Katalyse von Kondensations- und Zyklisierungsreaktion. Durch die Identifizierung des Ile-Cys-Dimers konnte zudem bewiesen werden, dass diese Kondensation in der Cy-Domänen-Reaktion durch Bildung der Peptidbindung erfolgt. Die Mutanten BacA1-2-Te**T875A** und BacA1-2-Te**R906A** sind nicht befähigt, ein Produkt zu bilden. Diese Beeinträchtigung der Kondensationsreaktion zeigt, dass Substratverknüpfung und anschließende Zyklisierung im gleichen aktiven Zentrum der Cy-Domäne stattfinden.

7 Diskussion

Der modulare Aufbau sowie die Domänenorganisation machen die NRPS zu interessanten Systemen für die enzymatische Produktion neuer Verbindungen. Das rationale Design aktiver Enzyme bietet ein großes Potential industriell interessante Moleküle *de novo* durch artifizielle NRPS zu synthetisieren. Die Auswirkungen von verschiedenen artifiziellen Modul- und Domänenkombinationen auf die enzymatischen Aktivitäten der Domänen und die Produktivität der neuen Synthetasen sind aber noch immer nicht vollständig bekannt. Auch wurden modifizierende Domänen nur in Einzelfällen in künstliche NRPS integriert. Zudem sind die Reaktionsabläufe, die von solchen speziellen Domänen katalysiert werden, in vielen Beispielen noch nicht aufgeklärt. Gerade das Verständnis der Einzelaktivitäten der Domänen ist aber eine wichtige Voraussetzung für eine sinnvolle Planung neuer NRPS.

Die beiden in dieser Arbeit beschriebenen Projekte geben neue Einblicke in die Möglichkeiten zur Entwicklung artifizieller NRPS. So wurden am Beispiel der Asp-Phe-Synthetasen verschiedene Fusionsstrategien verglichen, die zu Hybridenzymen mit gleichem Dipeptid-Produkt führten. Dies ist die erste Studie, in der unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten an Synthetasen eines Typs untersucht wurden. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Heterozyklisierungs-Domäne, eine modifizierende Domäne, welche die Integration von fünfgliedrigen Heterozyklen in das Peptidrückgrat katalysiert, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Cy-Domänen in Hybridenzymen funktional sind. Außerdem konnten durch Mutationsanalyse Einblicke in den Reaktionsmechanismus dieser besonderen Domäne ermöglicht werden.

7.1 Asp-Phe-Synthese an hybriden NRPS

Die Produktion des Dipeptides α -L-Aspartyl-L-Phenylalanin stellt ein interessantes Beispiel für die Synthese einer industriell wichtigen Verbindung an artifiziellen Peptidsynthetasen dar. Auf der Suche nach einem effizienten Biosynthesesystem für den Vorläufer des Süßstoffes Aspartam (α -L-Aspartyl-L-Phenylalaninmethylester) wurden verschiedene Strategien zur Modul- und Domänenfusion genutzt, durch deren Vergleich wichtige Informationen für die

rationale Konstruktion neuer NRPS erhalten wurden. Frühere Studien zeigten, dass generell verschiedene Strategien für die erfolgreiche Konstruktion neuer Enzyme genutzt werden können [Doekel, 2000; Doekel & Marahiel, 2000; Mootz et al., 2000; Schwarzer et al., 2001]. Jedoch sind alle diese Untersuchungen an unterschiedlichen Hybrid-systemen durchgeführt worden. Der große Vorteil, der in dieser Arbeit beschriebenen Analyse der Asp-Phe-Synthetasen, ist also die Einheitlichkeit des synthetisierten Produktpeptids.

7.1.1 Konstruktion dimodularer Asp-Phe-Synthetasen durch Domänenfusionen

Analog zu den bereits bekannten Strategien, wurden die Domänenfusionen, die zur Konstruktion der Asp-Phe-Synthetasen notwendig waren, innerhalb der Linkerbereiche zwischen den Domänen durchgeführt. Diese Interdomänen-Linker konnten anhand der Strukturen der A-Domänen von GrsA [Conti et al., 1997] und der PCP-Domäne aus TycC3 [Weber et al., 2000] sowie durch Sequenzvergleiche der verschiedenen Domänen identifiziert werden. Zwar wurden auch hybride Enzyme durch Fusionen innerhalb der Domänen, z.B. im Bereich der hochkonservierten *core*-Motive, durchgeführt, diese Untersuchungen führten jedoch teilweise zu inaktiven Enzymen [Elsner et al., 1997; Symmank et al., 1999]. Daher wurden die Asp-Phe-Synthetasen ausschließlich durch Fusionen in den wenig konservierten Bereichen aufgebaut.

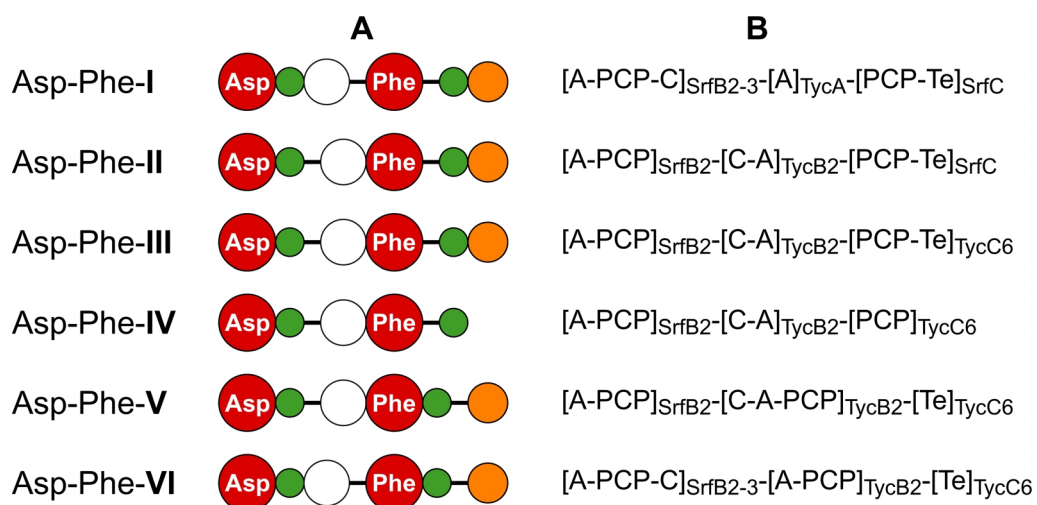


Abb. 7.1: Hybride Asp-Phe-Synthetasen. (A) Domänenorganisation der Asp-Phe-Synthetasen. (B) Beschreibung der Domänenzusammensetzung. Nativ zusammengehörige Domänen sind in eckigen Klammern zusammengefasst, Indizes geben den Ursprung der Domänen an.

Insgesamt sechs Asp-Phe-Synthetasen mit der Domänenreihenfolge A(Asp)-PCP-C-A(Phe)-PCP-Te wurden unter Verwendung von Domänen aus dem Tyrocidin- und dem Surfactin-Biosynthesesystem konstruiert.

7.1.2 Aktivität der Asp-Phe-Synthetasen

Alle getesteten Asp-Phe-Synthetasen (siehe Abb. 7.1) bildeten das erwartete Dipeptide α -Asp-Phe. Grundsätzlich können also verschiedene Strategien genutzt werden, um aktive Asp-Phe-Synthetasen zu erhalten. Allerdings zeigten die variierenden Umsatzraten zwischen 0.01 und 0.7 min^{-1} den Einfluss der unterschiedlichen Fusionsstellen und die Wahl der Domänen auf ihre Aktivität und die Kommunikation der einzelnen Domänen untereinander. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anordnung der Domänen und Module einen wichtigen Effekt auf die Domäneninteraktion und damit auf die Produktbildungsrate ausübt. Auf die Unterschiede in der Konstruktion und die Auswirkung auf die Aktivität der Enzyme wird später genauer eingegangen (vgl. Kapitel 7.1.5).

7.1.3 Konkurrenz zwischen α -Asp-Phe und β -Asp-Phe

Eine auffällige Eigenschaft der Asp-Phe-Synthetasen ist die Bildung des Nebenproduktes β -Asp-Phe (siehe Abb. 7.2). Andere Nebenprodukte, wie die Dipeptide Phe-Asp, Asp-Asp oder Phe-Phe konnten nicht nachgewiesen werden. Dies ist ein deutlicher Hinweis für die gerichtete Synthese des Asp-Phe-Dipeptids.

Auch die Bildung eines Asp-Phe-Diketopiperazins (Asp-Phe-DKP) konnte nicht beobachtet werden. Theoretisch könnte Asp-Phe-DKP durch eine nicht-katalysierte Produktabspaltung entstehen, bei der eine intramolekulare Zyklisierung eintritt. Das Fehlen des Asp-Phe-DKP zeigt, dass das Dipeptid tatsächlich enzymgebunden vorliegt, bis die Te-Domäne die Produktfreisetzung katalysiert. Auch die Analyse des Enzyms Asp-Phe-IV, welches keine C-terminale Te-Domäne besitzt, ist ein Indikator für die Stabilität der Bindung des Dipeptids am Enzym. Die Untersuchungen von Asp-Phe-IV zeigten keine Produktbildung, also auch keine DKP-Bildung.

Das unerwartete Nebenprodukt β -Asp-Phe, dessen Bildung schon bei der Charakterisierung des ersten Asp-Phe-Konstrukts beschrieben wurde [Doekel, 2000], ist im Hinblick auf die mögliche biotechnologische Anwendung der Asp-Phe-

Synthetasen problematisch. β -Asp-Phe kann nicht als Ausgangsverbindung für die Produktion von Aspartam genutzt werden kann.

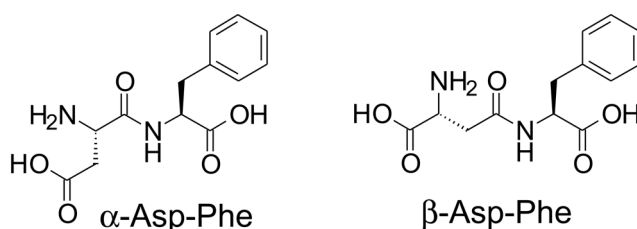


Abb. 7.2: Asp-Phe-Produkte.

Ein Vergleich der Effizienz der sechs Asp-Phe-Synthetasen zeigte aber, dass der Anteil des Nebenproduktes bei erhöhter Umsatzrate deutlich reduziert werden konnte (siehe Abb. 7.3). Es besteht also ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Umsatzrate und dem Verhältnis von α -Asp-Phe zu β -Asp-Phe. Die Abhängigkeit des Verhältnisses der beiden Produkte von der Umsatzrate der Hybridenzyme macht deutlich, dass ihre Bildung in direkter Konkurrenz zueinander steht.

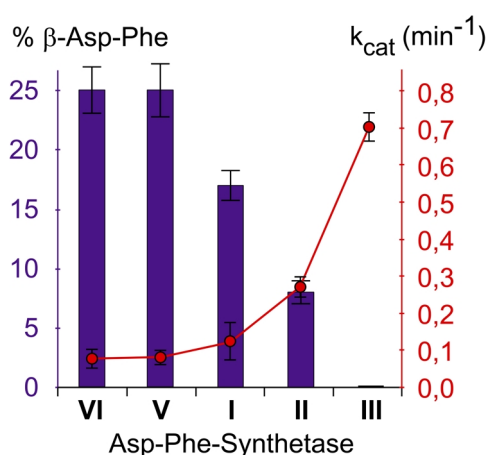


Abb. 7.3: Korrelation zwischen Umsatzrate und β -Asp-Phe-Anteil. Bei beschleunigter Produktbildung (rote Linie) nimmt der Anteil des β -Asp-Phe deutlich ab (blaue Säulen).

7.1.4 Mögliche Ursachen der β -Asp-Phe-Bildung

Die Bildung des β -Peptids durch die Verknüpfung der Substratamino­säuren über die β -Carboxylfunktion des Aspartats ist eine besondere Eigenschaft der in dieser Arbeit untersuchten Asp-Phe-Synthetasen. Wie schon früher beschrieben, kann die β -Asp-Phe-Produktion verschiedene Ursachen haben [Doekel, 2000]. Durch den Vergleich mehrerer Asp-Phe-Synthetasen lassen sich diese Ursachen jetzt detaillierter diskutieren.

7.1.4.1 α -Asp- und β -Asp-Adenylierung

Eine Möglichkeit, die zur Bildung von β -Asp-Phe führt, ist die Aktivierung von Aspartat als entsprechendes β -Aspartyl-Adenylat (β -Asp-AMP). Voraussetzung dafür ist die Erkennung der β -Carboxylgruppe durch die A-Domäne. Durch eine solche Unspezifität der A-Domäne käme es dann zur Konkurrenz zwischen der α -Asp-AMP- und β -Asp-AMP-Bildung (siehe Abb. 7.4).

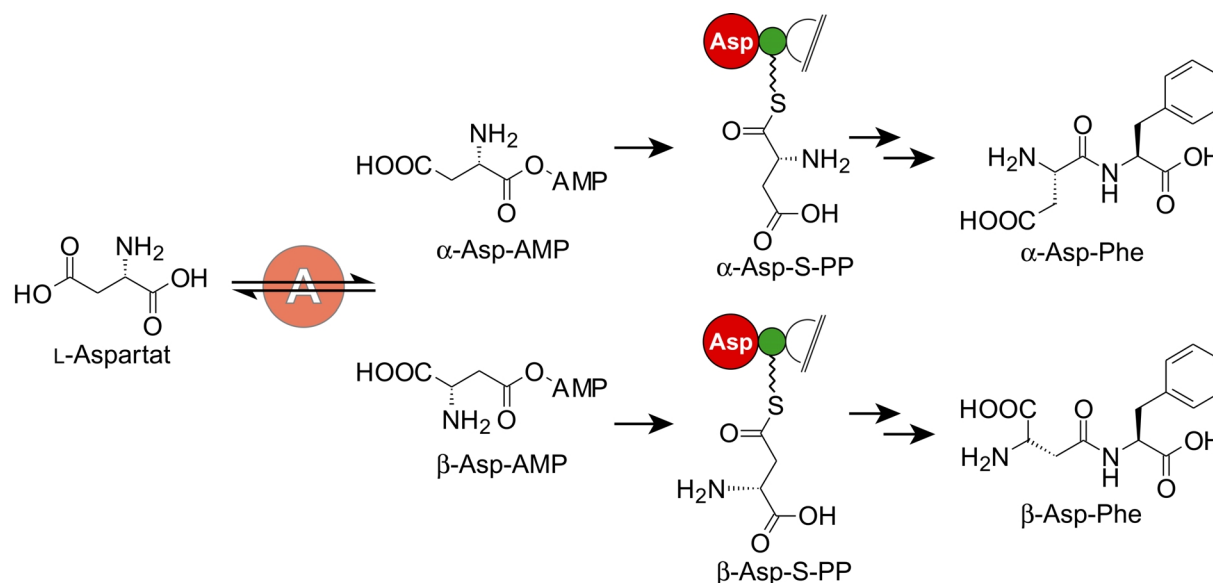


Abb. 7.4: Konkurrenz zwischen α - und β -Asp-AMP-Bildung. Eine Aktivierung von Aspartat als α -Asp-AMP bzw. β -Asp-AMP führt zu enzymgebundenen α -Asp-S-PP- oder β -Asp-S-PP-Intermediaten, durch deren Umsetzung α -Asp-Phe und β -Asp-Phe synthetisiert werden.

Aus verschiedenen Gründen erscheint die Aktivierung von Aspartat als β -Asp-AMP unwahrscheinlich. Wäre diese Aktivierung eine der A-Domäne inhärente Eigenschaft, so müsste die Verwendung der gleichen A-Domäne für die Konstruktion der Hybridenzyme zu immer gleichen α/β -Verhältnissen der Produkte führen, da in diesem Fall immer der gleiche Anteil des Substrates an der β -Carboxylgruppe aktiviert würde. Gerade die deutliche Abhängigkeit des α/β -Verhältnisses von der Umsatzrate ist also ein Indiz gegen die A-Domänen-katalysierte β -Asp-AMP-Bildung. Besonders das Fehlen des Nebenproduktes bei der Analyse der Synthetase Asp-Phe-III unterstützt diese Annahme.

Durch Strukturaufklärungen von A-Domänen und die daraus resultierende Definition des NRPS-Codes, konnten die aktive Tasche und die an der Substratbindung beteiligten Reste identifiziert werden [Conti et al., 1996; May et al., 2002; Stachelhaus et al., 1999]. Zwei Aminosäuren sind in allen A-Domänen konserviert:

Asp235 und Lys527 (Positionen bezogen auf PheA). Diese Reste sind für die Koordinierung der α -Amino- und α -Carboxylgruppe der Substrataminosäure verantwortlich. Aufgrund der Lage der Aminosäuren im katalytischen Zentrum, ist eine Koordination des Aspartats, die zur Aktivierung als β -Asp-AMP führt, unwahrscheinlich. Die beschriebenen konservierten Reste wären nicht in der Lage, das Aspartat zu koordinieren. Außerdem spricht die schon früher ermittelte Substratspezifität der SrfB2-A-Domäne gegen die β -Aktivierung [Doekel, 2000]. Diese Domäne ist hochspezifisch für L-Aspartat, weder D-Aspartat noch die strukturell ähnlichen Aminosäuren Asparagin, Glutamin oder Glutamat werden erkannt. Zusammengefasst ist eine durch die Asp-A-Domäne katalysierte Aktivierung der β -Carboxylgruppe daher als nicht wahrscheinlich anzusehen.

7.1.4.2 β -Asp-Phe-Produktion als Folge eines Umlagerungsprozesses

Die Abhängigkeit der Menge an gebildetem Nebenprodukt von der Umsatzrate unterstützt die Hypothese, dass ein Umlagerungsprozess während der Dipeptidsynthese für die Bildung von β -Asp-Phe verantwortlich ist. Abbildung 7.5 zeigt das Modell eines Umlagerungsmechanismus, der das Verhalten der einzelnen Asp-Phe-Synthetasen erklären kann.

Nach diesem Modell kann das PCP-gebundene α -Asp-S-PP durch einen intramolekularen nucleophilen Angriff der β -Carboxylgruppe auf das Carbonyl-C-Atom des Thioesters, unter Bildung des fünfgliedrigen 2-Amino-Succinanhydrids, vom Enzym abgespalten werden. Das entstandene 2-Amino-Succinanhydrid kann dann an seiner α - oder β -Position nucleophil vom Thiolat des 4'-PP-Cofaktors angegriffen werden. Durch Ringöffnung findet so die Rückreaktion zum α -Asp-S-PP oder die Umsetzung zum β -Asp-S-PP statt. Diese beiden isomeren Aspartyl-Thioester werden nachfolgend durch Kondensation mit Phenylalanin zu den enzymgebundenen α - und β -Asp-Phe-S-PP umgesetzt, welche dann, katalysiert durch die Te-Domäne, als die Produkte α - und β -Asp-Phe abgespalten werden.

Durch den induktiven Effekt der Aminogruppe des 2-Amino-Succinanhydrids ist die Ringöffnung zum α -Asp-S-PP bevorzugt, sodass überwiegend α -Asp-Phe gebildet wird. Aus diesem Grund konnte wahrscheinlich selbst bei den am wenigsten aktiven Enzymen nur ein β -Asp-Phe-Anteil von maximal 25% beobachtet werden. Zusätzlich kann durch schnelle Hydrolyse des 2-Amino-Succinanhydrids ($k_6 > k_4, k_5$)

Aspartat gebildet werden, welches dann wieder als Substrataminosäure zur Verfügung steht.

Die Abspaltung des enzymgebundenen Aspartats als 2-Amino-Succinanhydrid ist auch eine mögliche Erklärung für die geringe Beladungsaktivität des Asp-Moduls (10-15% der Enzyme werden mit Asp beladen; vgl. Kapitel 5.1.3.2). Möglicherweise sind alle NRPS-Systeme in denen sich Asp-Thioester akkumulieren einem solchen Umlagerungsprozess unterworfen. Ähnliche Mechanismen sind auch für andere Aminosäuren mit nucleophilen Seitenketten, wie Glutamat oder Ornithin, denkbar.

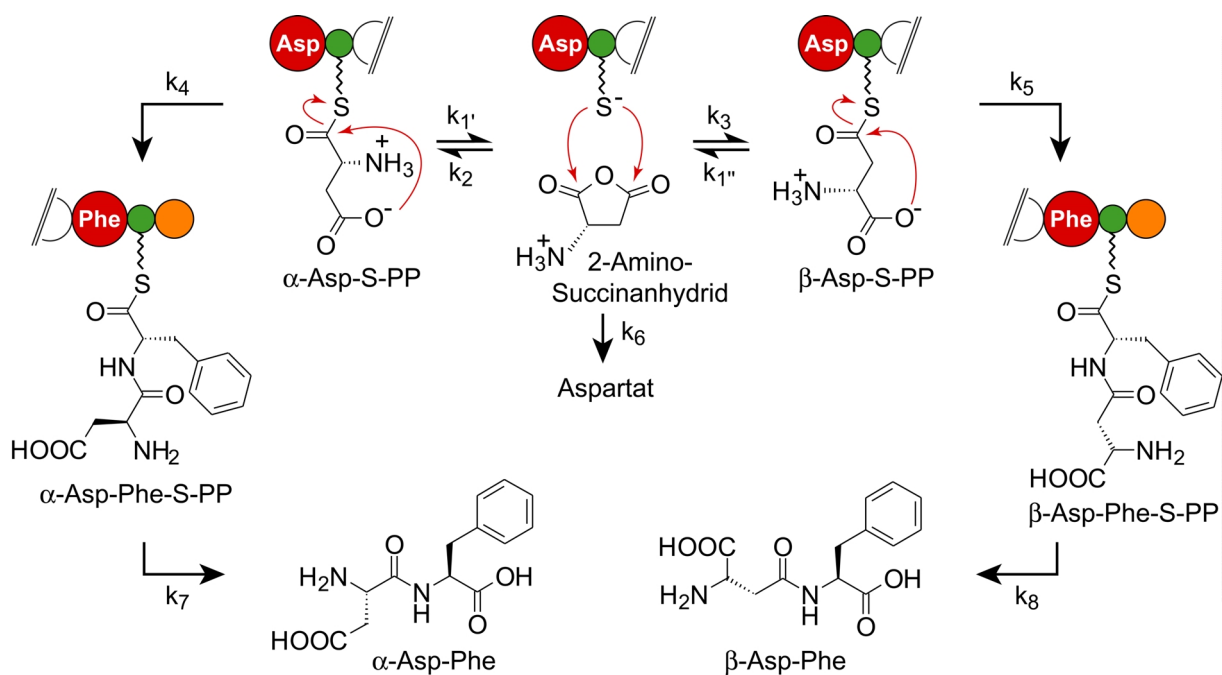


Abb. 7.5: β -Asp-Phe-Bildung als Folge eines Umlagerungsprozesses. Aus enzymgebundenem α -Asp-S-PP bildet sich durch einen intramolekularen nucleophilen Angriff das 2-Amino-Succinanhydrid, dessen Ringöffnung in α -Asp-S-PP oder β -Asp-S-PP resultiert. Beide Formen können umgesetzt werden, sodass die Dipeptide α -Asp-Phe und β -Asp-Phe produziert werden.

Die Abhängigkeit der Nebenproduktbildung von der Reaktionsgeschwindigkeit deutet darauf hin, dass die Umlagerung eintritt, sobald das enzymgebundene Aspartat nicht schnell genug umgesetzt wird. Bezogen auf den Mechanismus in Abb. 7.5 heißt das, wenn $k_4 \gg k_1$ gilt, wird überwiegend α -Asp-Phe gebildet. Wenn andererseits $k_4, k_5 \ll k_1, k_2, k_3$ ist, wird sich das Gleichgewicht zwischen α -Asp-S-PP und β -Asp-S-PP einstellen. In dieser Situation, die vermutlich bei den Enzymen Asp-Phe-V und Asp-Phe-VI gegeben ist (α/β -Verhältnis: 75:25), entspricht das Produktverhältnis dann dem Verhältnis der beiden möglichen Öffnungen des 2-Amino-Succinanhydrids. Laufen die Gleichgewichtsreaktionen mit annähernd

gleichen Geschwindigkeiten ab ($k_1, k_2, k_3 = k_4, k_5$), so ist ein α/β -Verhältnis zwischen 75:25 und 100:0 zu erwarten.

Sobald also das Aspartat zu lange auf dem 4'-PP-Arm der PCP-Domäne gebunden bleibt und nicht umgesetzt wird, erfolgt die Umlagerung. Ursachen dafür können eine verlangsamte Kondensationsreaktion (k_4) oder eine nicht effektive Freisetzung des Produktes (k_7) sein. Bleibt das fertige Dipeptid am Enzym gebunden, wird dadurch auch die Kondensationsreaktion beeinträchtigt, da kein neues Dipeptid gebildet werden kann.

7.1.5 Auswirkungen verschiedener Fusionsstrategien

Die größten Effekte hinsichtlich der Produktivität der rekombinanten Enzyme wurde bei der Veränderungen der Te-Fusion beobachtet. Dabei gibt es zwei wichtige Faktoren: i) die Wahl der Te-Domäne und ii) die Strategie zur Fusion der Te-Domäne.

Die Notwendigkeit einer produktfreisetzenden Te-Domäne wird anhand der Synthetase Asp-Phe-**VI** deutlich. Bedingt durch das Fehlen der Te-Domäne ist nur eine sehr ineffektive Produktbildung möglich ($k_{\text{cat}} = 0,01 \text{ min}^{-1}$). Das Enzym mit der höchsten Umsatzrate ist Asp-Phe-**III** ($0,7 \text{ min}^{-1}$), bei dem die PCP-Te-Einheit von TycC6 verwendet wurde. Die Te-Domäne ist also mit ihrem natürlich benachbarten PCP verbunden. Ein Austausch dieser Domänen gegen die Domänen PCP-Te von SrfC führte zur Reduktion der Produktbildung (Asp-Phe-**II**: $0,27 \text{ min}^{-1}$).

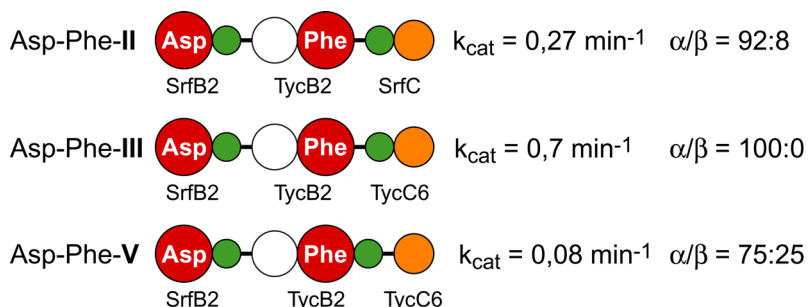


Abb. 7.6: Variationen der Te-Fusion. Die effizienteste Produktabspaltung wird durch die PCP-Te-Einheit von TycC katalysiert.

In bisher untersuchten Hybridsynthetasen lieferte die Te-Domäne aus dem Surfactin-Biosynthesesystem die höchsten Umsatzraten [Schwarzer et al., 2001]. Im Fall der Asp-Phe-Synthetasen ist aber die Te-Domäne aus dem Tyrocidin-System am effektivsten. Die Te-Domänen besitzen also unterschiedliche Substratselektivitäten. Asp-Phe wird von der Te_{Tyc} -Domäne mehr toleriert als von der Te_{Srf} -Domäne. Diese

Substrattoleranz muss also bei der Konstruktion artifizieller NRPS berücksichtigt werden.

Größere Auswirkungen auf die Umsatzraten hat, im Gegensatz zur Wahl der Te-Domäne, die Veränderung der Fusionsstelle (siehe Abb. 7.6). Wie Asp-Phe-III besitzt Asp-Phe-V, die Te-Domäne des Tyc-Systems. In diesem Fall blieb aber das Elongationsmodul TycB2 intakt, d.h. es wurde zwischen dem PCP und der Te-Domäne fusioniert. In diesem Fall ist die Te-Domäne also nicht mit dem nativen PCP verbunden, was zu einer zehnfachen Verringerung der Produktbildungsrate verglichen zu Asp-Phe-III führte.

Die Te-Domänen katalysieren die Produktfreisetzung also effizienter, wenn sie mit ihren kognaten PCP-Domänen verbunden sind. PCP-Domänen, die nativ den Te-Domänen benachbart sind (PCP^{Te}), zeigen in der Primärsequenz nur geringe Unterschiede zu den C-Domänen benachbarten PCP-Domänen (PCP^C). So werden Sequenzhomologien von 30-50% gefunden, was den Übereinstimmungen von PCP^C -Domänen untereinander entspricht. Aufgrund dieser Ähnlichkeit ist es wahrscheinlich, dass strukturelle Veränderungen, die durch die Fusionen hervorgerufen werden, die Aktivität der Domänen beeinflussen. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Einzelaktivitäten der Domänen von Änderungen in den Interdomänen-Linkern unbeeinflusst sind, jedoch ist noch nicht hinreichend bekannt, wie sich diese Modifikationen auf die Kommunikation zwischen den Domänen auswirken. Bislang wurden Produktfreisetzungen in Hybridsynthetasen durch Fusionen zwischen PCP und Te-Domäne erreicht [Schwarzer et al., 2001]. Die Untersuchungen an den Asp-Phe-Synthetasen erweitern somit das Wissen über verschiedene Strategien der Te-Domänenfusion.

Hervorgehoben wird die Bedeutung einer effektiven Te-Domäne besonders durch die Produktivität des Hybridenzym Asp-Phe-III. Dem Umlagerungsmechanismus (Abb. 7.5) zufolge wird ausschließlich α -Asp-Phe gebildet, wenn k_4 wesentlich höher ist als k_1 , die Elongation also schneller abläuft, als die Bildung des 2-Amino-Succinanhydrids.

Eine langsame Produktfreisetzung durch die Te (k_7) führt auch zur Verringerung der Geschwindigkeit der Kondensation (k_4). Die bessere katalytische Aktivität der Te-Domäne im Hybridenzym Asp-Phe-III gegenüber den anderen Asp-Phe-Synthetasen verringert also deutlich den Einfluss der Terminationsreaktion auf die Gesamtgeschwindigkeit der Peptidsynthese. Dadurch ist eine schnelle

Umsetzung des gebundenen α -Asp-S-PP möglich, welche die Umlagerung zum β -Asp-S-PP unterbindet.

Ein weiterer wichtiger Unterschied der Asp-Phe-Synthetasen untereinander ist die Lage der Fusionsstelle zwischen Asp- und Phe-umsetzenden Modulen. Die Synthetase Asp-Phe-I wurde konstruiert, indem die Phe-aktivierende A-Domäne des nativen Initiationsmoduls (TycA) C-terminal an die Domänen A-PCP-C von SrfB2-3 fusioniert wurde. Ebenso wie im Asp-Phe-II, wird die Termination durch die Srf-Te-Domäne, die mit ihrem nativen PCP verbunden ist, sichergestellt. Trotzdem zeigte sich eine geringe Aktivität und eine höhere β -Asp-Phe-Produktion (Asp-Phe-I $k_{\text{cat}} = 0,12 \text{ min}^{-1}$ α/β : 83:17; Asp-Phe-II $k_{\text{cat}} = 0,27 \text{ min}^{-1}$ α/β : 92:8) (siehe Abb. 7.7). Der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist hier wahrscheinlich die Kondensationsreaktion.

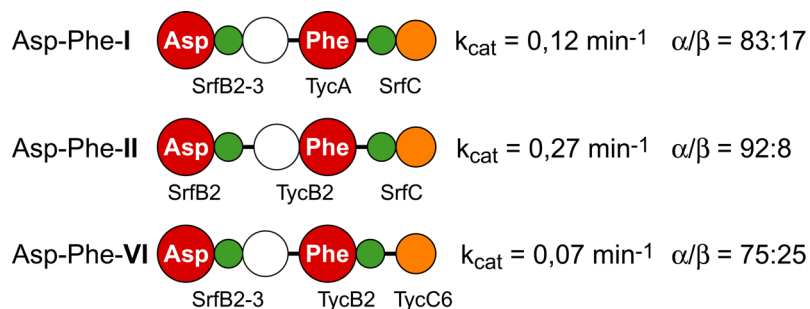


Abb. 7.7: Variationen der Modul-Fusion. Höchste Aktivität wird beobachtet, wenn C- und A-Domänen im natürlichen Verbund vorliegen.

Dies kann daher rühren, dass die A-Domäne des natürlichen Initiationsmoduls in einem artifiziellen Elongationsmodul geringere Aktivität zeigt, bzw. dass die Kommunikation zwischen den Domänen aufgrund des Ursprungs der A-Domäne nicht optimal ist.

Des Weiteren kann die schon beschriebene intrinsische Selektivität der C-Domäne die Reaktionsgeschwindigkeit limitieren (vgl. Kapitel 2.3.1). Die C-Domäne des Moduls SrfB3, die Bestandteil der Synthetasen Asp-Phe-I und Asp-Phe-VI ist, besitzt, bedingt durch ihre natürliche Umgebung im Surfactinoperon, auf der Akzeptor-Seite eine Spezifität für Leucin. In den Asp-Phe-Synthetasen muss diese C-Domäne aber Phenylalanin erkennen und umsetzen. Verglichen zu den Synthetasen, die C-Domänen mit Phe-Spezifität besitzen, kann diese Domänenzusammensetzung die Aktivität beeinflussen.

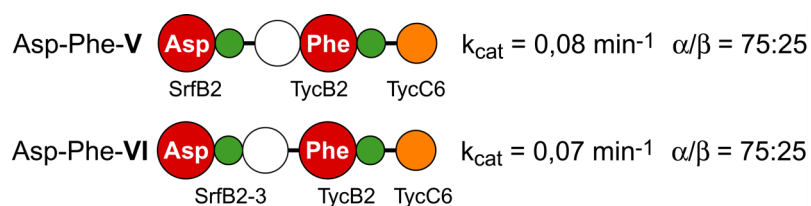


Abb. 7.8: Variationen der Modul-Fusion. Konstrukte Asp-Phe-V und Asp-Phe-VI.

Der Vergleich der Konstrukte Asp-Phe-V und Asp-Phe-VI ($k_{cat} = 0,08 \text{ min}^{-1}$ $\alpha/\beta: 75:25$ bzw. $k_{cat} = 0,07 \text{ min}^{-1}$ $\alpha/\beta: 75:25$) verdeutlicht noch einmal den Einfluss der Produktfreisetzung auf Umsatzrate und β -Asp-Phe-Bildung (siehe Abb. 7.8). Einflüsse durch die Strategie der Modulfusion (PCP-C- oder C-A-Fusion) fallen kaum ins Gewicht, da die Produktbildung durch die langsame Terminationsreaktion limitiert wird.

7.1.6 Nichtribosomale Asp-Phe-Synthetasen - Zusammenfassung

Die vergleichende Studie hybrider Asp-Phe-Synthetasen unterstützt den Vorschlag, C- und A-Domänen des gleichen Moduls als katalytische Einheit zu betrachten. Fusionen von NRPS-Modulen sollten also vorzugsweise zwischen PCP- und C-Domäne durchgeführt werden, um die C-A-Verbindung intakt zu halten. Zwar zeigt die Aktivität von Asp-Phe-I, dass es prinzipiell möglich ist, native Initiationsmodule für die Konstruktion von hybriden Elongationsmodulen zu verwenden, der Rückgang der katalytischen Effizienz zeigt aber, dass die Domäneninteraktion nicht optimal ist.

Gleichsam konnten erfolgreich A-PCP-Einheiten nativer Elongationsmodule für die Initiation hybrider Synthetasen genutzt werden, wie es im Fall der Asp-Phe-Synthetasen realisiert wurde.

Bei der Wahl der Te-Domänen muss beachtet werden, dass es offensichtliche Unterschiede in der Selektivität der Te-Domänen gibt, welche ihre Aktivität in hybriden NRPS beeinflussen könnten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in artifiziellen Systemen die Fusion von PCP-Te-Einheiten vorteilhaft sein kann, um eine bestmögliche Katalyse zu erreichen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass generell verschiedene Strategien erfolgreich genutzt werden können, um Dipeptid-Synthetasen rational zu entwickeln. Offensichtliche Unterschiede in der Produktivität untermauern aber die Bedeutung der uneingeschränkten Domäneninteraktion.

7.2 Untersuchung der Heterozyklisierung in NRPS

Wie frühere Untersuchungen zeigten, lassen sich artifizielle Synthetasen rational durch Domänen- und Modulfusionen konstruieren. Besonders die in dieser Arbeit beschriebenen Asp-Phe-Synthetasen verdeutlichen das Potential der NRPS für die Produktion industriell bedeutender Verbindungen. Die bisherigen Versuche der Entwicklung von Fusionsproteinen beschränken sich allerdings hauptsächlich auf die Verwendung der *core*-Domänen C, A und PCP sowie die Te-Domäne. Die strukturelle Vielfalt der nichtribosomal synthetisierten Peptide wird aber gerade auch durch die modifizierende Domänen ermöglicht.

Eine solche spezielle Domäne ist die Heterozyklisierungs-(Cy)-domäne, die in zahlreichen Systemen die Bildung fünfgliedriger Heterozyklen katalysiert (siehe Abb. 7.8).

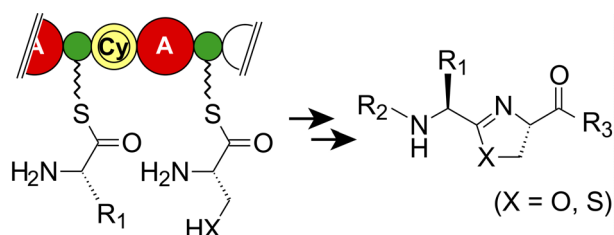


Abb. 7.9: Produkt der Heterozyklisierungsdomäne.

Für eine erfolgreiche Planung neuer Synthetasen ist das Verständnis der Reaktionen der beteiligten Domänen unerlässlich. A- und C-Domänen sind in ihrer Katalyse bereits gut untersucht. Die Strukturanalysen von A-, C- und PCP-Domänen erweiterten das Verständnis dieser essentiellen Domänen. Zwar wird für die Cy-Domäne eine der C-Domäne homologe Struktur vorausgesagt [Keating et al., 2002], genaue Kenntnisse liegen aber weder über die Struktur noch für den Mechanismus vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun ein Modellsystem entwickelt, dass sowohl als Ausgangskonstrukt diente, um das Potential der Cy-Domäne in Hybridenzymen zu analysieren, als auch die Möglichkeit der Untersuchung der bis dahin unbekannten Reaktionsabfolge bot.

7.2.1 Das BacA1-2-Te-Modellsystem

Voraussetzung für die Untersuchung der Cy-Domäne ist ein einfaches und zugleich effektives Enzym, das eine für *in vitro*-Untersuchungen ausreichende

Produktbildung liefert. Viele Cy-Domänen sind in ungewöhnlichen Operons organisiert. So findet man innerhalb der entsprechenden Synthetasen Übergänge von NRPS- zu PKS-Anteilen, z.B. im Myxothiazolsystem. Auch findet man ungewöhnliche Domänenfolgen wie z.B. in der Vibriobactin-Synthetase VibF (Cy-Cy-A-C-PCP-C).

Die Bacitracin-Synthetase A (BacA) stellt hingegen ein ideales, kolineares NRPS-System zur Analyse der Cy-Domäne dar. BacA schien geeignet, da es verschiedene Vorteile anderen heterozyklenbildenden Systemen gegenüber aufweist. Das erste, Ile-aktivierende Modul ist ein natürliches Initiationsmodul. Im zweiten Modul befindet sich die Cy-Domäne. Eine dimodulare Synthetase aus den ersten beiden Modulen vom BacA (BacA1-2) besitzt also einen natürlichen N-Terminus. Veränderungen der Aktivität durch künstlich veränderte Domänenorganisationen sind also ausgeschlossen. Außerdem besitzt BacA1-2 keine weiteren optionalen, modifizierenden Domänen, sodass im Prinzip die einfachste denkbare Domänenanordnung vorliegt, in der lediglich die peptidbindungsbildende C-Domäne durch eine Cy-Domäne ersetzt ist.

7.2.1.1 Produktivität des Modellsystems BacA1-2-Te

Ausgehend von den ersten beiden Modulen des Bacitracin-Biosynthesystems sollte durch C-terminale Fusion verschiedener Te-Domänen ein dimodulares System erhalten werden, das *in vitro* eine für weitere Untersuchungen ausreichende Aktivität zeigte. Dafür wurden zum einen Te-Domänen des Surfactin- und des Tyrocidinsystems gewählt, da diese in anderen hybriden Peptidsynthetasen ihre Funktionalität gezeigt hatten [Doekel & Marahiel, 2000; Mootz et al., 2000; Schwarzer et al., 2001]. Zum anderen wurde die Te-Domäne des Yersiniabactinsystems verwendet, da aufgrund der Ähnlichkeit des Yersiniabactins zum erwarteten Produkt Ile-Cys^{Thiazolin} eine effektive Produktfreisetzung zu erwarten war.

Obwohl in anderen Hybridsystemen aktiv, zeigte die Te_{Srf}-Domäne in der Synthetase BacA1-2-Te_{Srf} keine Aktivität. Bedingt durch die ungewöhnliche Struktur des Ile-Cys^{Thiazolin} Produktes scheint diese Te-Domäne nicht in der Lage zu sein, es im aktiven Zentrum zu koordinieren und die Thioesterspaltung zu katalysieren.

Die Te_{Yer}-Domäne war zwar befähigt, das Produkt vom Enzym zu spalten, die erwartet hohe Effizienz konnte jedoch nicht bestätigt werden.

So führte die Fusion des Cy-Domäne enthaltenden Dimoduls BacA1-2 mit der Te_{Tyc}-Domäne zur erfolgreichen Konstruktion einer Hybridsynthetase BacA1-2-Te_{Tyc},

welche die *in vitro* Analyse der Heterozyklisierungsreaktion in der nichtribosomalen Peptidbiosynthese ermöglicht.

Sowohl die Einzelaktivitäten der Domänen als auch die Umsatzrate verdeutlichen die Durchführbarkeit der Fusion von Cy-Domäne enthaltenden Modulen also auch das große Potential für das *de novo* Design von hybriden NRPS. Gleichzeitig zeigt das Verhalten der verschiedenen, in den BacA1-2-Te-Konstrukten getesteten Te-Domänen, wie auch bei den Asp-Phe-Synthetasen beobachtet, die unterschiedliche Toleranz gegen-

über dem Produkt. Während die Te_{Srf}-Domäne nicht in der Lage ist, das heterozyklische Produkt vom Enzymtemplat abzuspalten, zeigen die Te-Domänen aus Tyrocidin- und Yersiniabactinsystem die katalysierte Freisetzung des Ile-Cys_{Thiazolin}. Gerade die Fähigkeit der Te_{Tyc}-Domäne, diese ungewöhnliche Verbindung als Substrat zu akzeptieren und umzusetzen, verdeutlicht die große Bedeutung dieser Domänen-Gruppe für die Konstruktion hybrider Peptidsynthetasen.

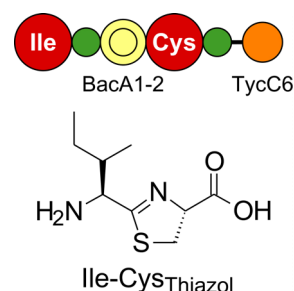


Abb. 7.10: Das Modellsystem. BacA1-2-Te mit dem Produkt Ile-Cys_{Thiazolin}.

7.2.2 Die Cy-Domäne in dimodularen Hybridsynthetasen

Das Modellsystem BacA1-2-Te_{Tyc} bietet die Möglichkeit, das biokombinatorische Potential vom Cy-Domänen-haltigen Modulen zu analysieren. Bisherige Ansätze der Konstruktion hybrider Peptidsynthetasen waren beschränkt auf Module, die die *core*-Domänen C, A und PCP enthielten. Um die Durchführbarkeit ähnlicher Versuche mit der Cy-Domäne zu zeigen, wurden Domänen des Modellsystems gegen Domänen aus anderen Systemen, in denen Heterozyklen gebildet werden, ausgetauscht.

Da zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt war, wie sich Cy-Domänen in Hybridenzymen verhalten, und ob sie eine den C-Domänen vergleichbare Selektivität besitzen, wurden verschiedene Fusionsstrategien untersucht. Analog den schon früher beschriebenen Fusionsproteinen [Mootz et al., 2000] wurden zum einen Domänenfusionen in den Linkerregionen zwischen PCP- und Cy-Domäne durchgeführt (Konstrukte-I). In dieser Anordnung blieb der natürliche Zusammenhang von Cy- und nachfolgender A-Domäne erhalten. Besitzt die Cy-Domäne eine Akzeptor-Selektivität wie die C-Domäne - die strukturelle und funktionelle Homologie

beider Domärentypen lässt eine solche Selektivität wahrscheinlich erscheinen –, so sollte diese Anordnung eine optimale Substratumsetzung ermöglichen.

Zum anderen wurden die Fusionsproteine durch Kombination zwischen Cy- und A-Domäne hergestellt (Konstrukte-II), sodass Einblicke in die Substrattoleranz der Cy-Domäne möglich sind.

Wie schon in Kapitel 2.3.3 beschrieben, treten in nichtribosomal produzierten Peptiden die Heterozyklen der Oxazolin- und der Thiazolin-Familie sowie die verschiedenen Oxidationsstufen auf. Für die Untersuchung zur Durchführbarkeit von Cy-Domänenfusionen wurden daher solche Domänen gewählt, deren Verwendung zur Konstruktion dimodularer Synthetasen führte, die veränderte Produkte, verglichen zum Dipeptid Ile-Cys_{Thiazolin} des Modellsystems, synthetisieren. Durch die Fusionen zwischen den ersten Domänen der Bacitracin-Synthetase A (BacA) und Domänen aus der Mycobactin-Synthetase B (MbtB) sowie durch Kombination von BacA-Domänen mit Teilen der Myxothiazol-Synthetase D (MtaD) wurden vier Hybridenzyme erhalten (siehe Abb. 7.10).

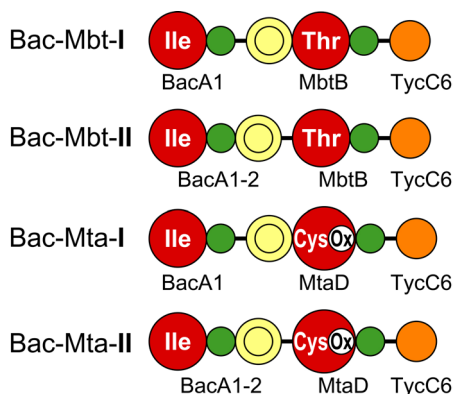


Abb. 7.11: Cy-Domänen in hybriden Peptidsynthetasen.

Domänenfusionen wurden zwischen PCP- und Cy-Domäne oder Cy- und A-Domäne durchgeführt.

Die Mycobactin-Synthetasen von *M. tuberculosis* produzieren verschiedene Mycobactin-Derivate, die sich unter anderem im Heterozyklus, der aus Salicylat und Threonin oder Serin gebildet wird, unterscheiden. Die A-Domäne der Synthetase MbtB besitzt Selektivitäten für die chemisch verwandten Aminosäuren Serin und Threonin. Daher sollten bei einer vollen Funktionalität der Bac-Mbt-Konstrukte Ile-Thr_{Oxazolin} und Ile-Ser_{Oxazolin} gebildet werden (siehe Abb. 7.11).

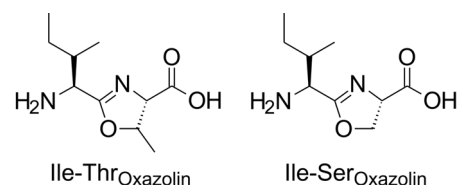


Abb. 7.12: Erwartete Produkte der Bac-Mbt-Konstrukte.

Strukturelle Besonderheit des Myxothiazols ist eine Bisthiazoleinheit, deren Synthese von zwei NRPS-Modulen in den Synthetasen MtaC und MtaD des Myxothiazol-Biosyntheseoperons katalysiert werden (siehe Anhang 8.3). In beiden Modulen befinden sich Ox-Domänen, die für die Oxidation der gebildeten Thiazolin-Ringe zu den Thiazol-Ringen verantwortlich sind. Für die Konstruktion der Bac-Mta-Enzyme wurde das MtaD-NRPS-Modul ausgewählt. Bei der Verwendung des Moduls MtaD stellte sich die Frage, ob die in die A-Domäne integrierte Ox-Domäne uneingeschränkte Funktionalität in den resultierenden Hybridsynthetasen besitzt. Die Domänenfusionen mit dieser speziellen A-Domäne konnten, wie für andere Konstrukte bereits beschrieben, durchgeführt werden [Doekel, 2000], da die Termini und die Linkerregionen durch die Insertion der Ox-Domäne nicht verändert sind. Funktionale Bac-Mta-Hybride sollten so befähigt sein, das oxidierte Produkt Ile-Cys_{Thiazol} zu synthetisieren.

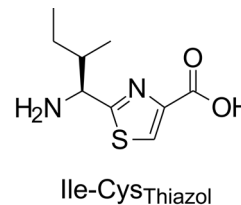


Abb. 7.13: Erwartetes Produkt der Bac-Mta-Konstrukte.

7.2.2.1 Enzymatische Aktivität der Bac-Mbt-Hybridsynthetasen

Die Bestimmung der A-Domänen-Selektivität sowie die Beladungsreaktion der Bac-Mbt-Konstrukte zeigten die erwarteten Aktivitäten. Unverändert im Vergleich zum Modellsystem ist in beiden Hybridenzymen, Bac-Mbt-I und Bac-Mbt-II, die Aktivität des ersten Moduls. Isoleucin wird aktiviert und kovalent am 4'-PP-Arm gebunden. Die A-Domäne des zweiten Moduls aktiviert mit hoher Selektivität das aufgrund des NRPS-Codes erwartete Threonin und auch das chemische verwandte Serin. Da die Aktivierung dieser beiden Aminosäuren durch MbtB auch im Mycobactin-System zur Synthese von Oxazolin bzw. β -Methyloxazolin enthaltenden Derivaten führt [Quadri et al., 1998a], wird die Serin-Selektivität offensichtlich nicht durch die artifizielle Fusion hervorgerufen, sondern ist eine inhärente Eigenschaft der Thr-A-Domäne des MbtB.

Obwohl Bac-Mbt-I und Bac-Mbt-II keine Unterschiede in der Aminosäureaktivierung zeigten, konnte nur für Bac-Mbt-I Produktbildung nachgewiesen werden. In Abhängigkeit beider Substrataminosäuren und ATP konnte sowohl die Produktion des Ile-Thr_{Oxazolin} als auch des Ile-Ser_{Oxazolin} detektiert werden. Die unterschiedliche Aktivität der Konstrukte lässt sich offensichtlich auf die

Fusionsstrategie zurückführen. Während im Konstrukt Bac-Mbt-I der native Cy-A-Übergang erhalten blieb, wurde in Bac-Mbt-II die Fusionsstelle zwischen Cy- und A-Domäne gelegt.

Aufgrund der Ähnlichkeit von C- und Cy-Domäne ist eine naheliegende Erklärung für die Unfähigkeit des Bac-Mbt-II, ein Produkt zu bilden, eine der C-Domäne äquivalente Substratspezifität der Cy-Domäne. Diese Domäne aus BacA setzt in ihrem natürlichen Zusammenspiel mit den benachbarten Domänen Cystein um. Im Hybridenzym Bac-Mbt-II wurde sie aber an eine Thr/Ser-aktivierende A-Domäne fusioniert. Es ist daher möglich, dass Threonin und Serin nicht als Substrate akzeptiert werden und die Kondensationsreaktion sowie die Zyklisierung nicht katalysiert werden können.

7.2.2.2 Enzymatische Aktivität der Bac-Mta-Hybridsynthetasen

Im Gegensatz zu den Bac-Mbt-Konstrukten zeigten Bac-Mta-I und Bac-Mta-II bereits bei der Analyse der Adenylierungsreaktion unerwartete Eigenschaften. Im Vergleich zum Ausgangsenzym BacA1-2-Te_{Tyc} war zwar die Aktivierung von Isoleucin unbeeinflusst, doch die zweite kognate Aminosäure Cystein wurde nur in sehr geringem Maß aktiviert. Stattdessen konnte für die zweite A-Domäne eine deutliche Adenylierungsaktivität für Threonin und Serin nachgewiesen werden.

In der Produktanalyse von Bac-Mta-I konnte anschließend auch die Synthese des entsprechenden Ile-Thr_{Oxazol} nachgewiesen werden. Wurde Bac-Mta-I mit Isoleucin und Cystein inkubiert, konnte aber trotz der nur geringen Aktivierung von Cystein auch das erwartete Produkt Ile-Cys_{Thiazol} detektiert werden. Wie schon beim Bac-Mbt-Hybrid war das zweite Konstrukt Bac-Mta-II, mit der Fusion zwischen Cy- und A-Domäne, in der Produktbildung inaktiv.

Die Aktivierung und Integration von Threonin durch Bac-Mta-I war unerwartet, da zum einen der NRPS-Code der MtaD-A-Domäne die Aktivierung von Cystein erwarten lässt [Stachelhaus et al., 1999] (vgl. Anhang, Tab. 8.2). Zum anderen sind ausschließlich Myxothiazol-Derivate mit Thiazol-Ringen bekannt. Zudem konnten Fütterungsexperimente mit dem Produzentenstamm *Stigmatella aurantiaca* DW 4/3-1 beweisen, dass ausschließlich Cystein ins Produkt inkorporiert wird [Silakowski et al., 1999]. Entsprechende Oxazol-Verbindungen werden *in vivo* nicht gebildet. Offensichtlich besitzt der Myxothiazol-Produzentenstamm einen Kontroll-

mechanismus, der die Synthese bzw. Freisetzung des Oxazol-Derivats unterbindet. Eine solche Kontrolle ist im Bac-Mta-Hybridenzym wahrscheinlich nicht vorhanden. Aktuelle Ergebnisse unterstützen die These eines effektiven Kontrollmechanismus, da durch Deletion der MtaD-Ox-Domäne im nativen System kein verändertes Produkt gebildet, sondern ein Nicht-Produzentenstamm erhalten wird [Weinig et al., 2003].

Die Ox-Domäne von MtaD repräsentiert im Übrigen eine andere, sehr interessante Gruppe der optionalen Domänen. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Ox-Domäne des Epothilon-Biosynthesesystems in *E. coli* heterolog überproduziert und als distinktes Enzym in der aktiven, FMN-enthaltenden *holo*-Form erhalten werden kann [Schneider et al., 2003]. Wie durch die Produktion der β -Methyloxazol- und Thiazol-Dipeptide durch Bac-Mta-I demonstriert, kann die Ox-Domäne auch in hybriden Synthetasen in aktiver Form erhalten werden. Diese Erkenntnis macht auch die Ox-Domäne zu einem interessanten Werkzeug für die Entwicklung neuer hybrider NRPS.

7.2.4 Die Cy-Domäne-Hybride – Zusammenfassung und Ausblick

Zusammengefasst demonstrieren die aktiven Bac-Mbt- und Bac-Mta-Hybride die Durchführbarkeit von Modulfusionen mit der Cy-Domäne. Bekannte Strategien zur Kombination von Domänen können also auch auf diese besondere Domäne angewendet werden. Erweitert wird das biokombinatorische Potential durch den Aktivitätsnachweis der Ox-Domäne im heterolog produzierten Hybridenzym.

Die hier gezeigten Ergebnisse der Cy-Domänen-Modulfusionen erweitern die Möglichkeiten der rationalen Entwicklung von NRPS. So ist es möglich Biosynthesetemplate für die Produktion bislang unbekannter, heterozyklischer Verbindungen zu konstruieren, die aufgrund der speziellen Eigenschaften der Heterozyklen (vgl. Kapitel 2.3.3) von hohen pharmakologischen Interesse sind. Auch eröffnen die Hybridsynthetasen die Möglichkeit der Integration modifizierter Module in native Biosynthesesysteme. Zum Beispiel sind gezielte Veränderungen bekannter Naturstoffe denkbar, um andere oder verbesserte Eigenschaften zu erzielen.

Die Synthetasen Bac-Mbt-II und Bac-Mta-II sind nicht befähigt, die modifizierten Dipeptide zu synthetisieren. Dies legt die Vermutung nah, dass die Cy-Domäne eine ähnliche Selektivität besitzt, wie sie für die C-Domäne beschrieben wurde. Es bedarf aber weiterer Untersuchungen, um dies endgültig zu klären.

7.2.5 Mutationsanalyse der Cy-Domäne

Cy-Domänen katalysieren bedeutende Modifikationen im Rückgrat des synthetisierten Peptids. Sie sind modifizierende Domänen der NRPS, die konventionelle C-Domänen in speziellen Modulen ersetzen und aufgrund ihrer Position neben der Bildung des Heterozyklus auch die Reaktion der C-Domäne übernehmen. Insgesamt werden drei Reaktionen katalysiert: i) die Verknüpfung der Substrate, ii) die Bildung des fünfgliedrigen Rings und iii) die Dehydratisierung, die zur Bildung der Heterozyklen der Thioazolin- und Oxazolin-Familie führt. Der genaue Ablauf dieser Reaktionen war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Wie in Abb. 7.13 gezeigt sind zwei Wege zur Ausbildung des Heterozyklus denkbar:

a) Einerseits kann zunächst die Peptidbindung gebildet werden, gefolgt von der Zyklisierung durch einen nucleophilen Angriff des Heteroatoms der Seitenkette von Cystein, Serin oder Threonin auf das Carbonyl-C-Atom der Peptidbindung. Abschließend erfolgt dann die Dehydratisierung.

b) Alternativ kann zunächst der nucleophile Angriff der Seitenkette, unter Bildung eines Oxoesters bzw. Thioesters, erfolgen. Die Bildung des Rings ist dann das Resultat eines intramolekularen Angriffs der Aminogruppe auf das Carbonyl-C-Atom des neu gebildeten Esters.

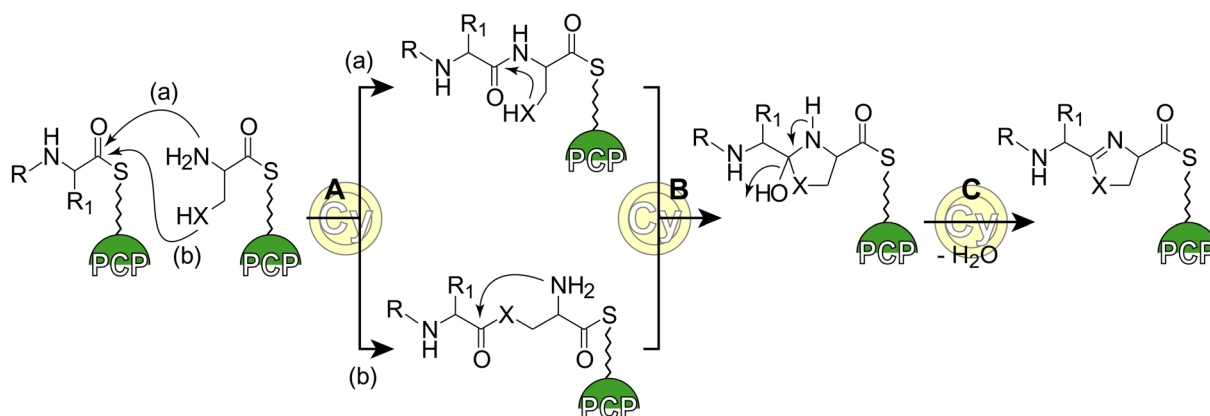


Abb. 7.14: Reaktionen der Cy-Domänen. Drei Reaktionen werden von der Cy-Domäne katalysiert: (A) die Verknüpfung der Substrate, (B) die Ringbildung und (C) die Dehydratisierung zum Dihydroheteroaromaten. Die Kondensation der Substrate erfolgt durch Bildung einer Peptidbindung (a) oder eines Oxo- bzw. Thioesters (b).

Um die chronologische Reihenfolge von Kondensation und Zyklisierung zu untersuchen und zu zeigen, welcher der beiden alternativen Wege zur Bildung der Thiazoline und Oxazoline führt, wurden Mutationsanalysen am Modellsystem BacA1-2-Te_{Tyc} durchgeführt.

Aufgrund der vorhergesagten strukturellen Ähnlichkeit von Cy- und C-Domänen [Keating et al., 2002] wurde vermutet, dass zunächst eine der C-Domänen entsprechende Kondensationsreaktion stattfindet, in der die Peptidbindung gebildet wird. Untersuchungen am ungewöhnlichen Vibriobactin-Biosynthesesystem lassen außerdem die Unabhängigkeit der Kondensation von der nachfolgenden Zyklisierung vermuten [Marshall et al., 2001; Marshall et al., 2002]. Die zweite Cy-Domäne in der Synthetase VibF-Cy2 (VibF-Cy2, vgl. Kapitel 6.3.1) ist nicht in der Lage, den Heterozyklus zu bilden, katalysiert aber die Verknüpfung der Substrate. Beim Vibriobactin-System handelt es sich, wegen der ungewöhnlichen Domänenorganisation Cy-Cy-A-PCP-C-PCP im VibF, um ein spezielles NRPS-System. Daher konnten die Ergebnisse nicht als entgültiger Beweis für die Reaktionsabfolge der Cy-Domäne angesehen werden. Allerdings war das Vib-System bei der Identifizierung potentiell wichtiger Reste zur Planung der in dieser Arbeit beschriebenen Mutationsanalysen hilfreich (vgl. Kapitel 6.3.1).

Durch Sequenzvergleiche verschiedener Cy-Domänen mit der VibF-Cy2 wurden Aminosäurereste identifiziert, die einen möglichen Einfluss auf die Katalyse der Cy-Domäne ausüben. Die auffälligsten Sequenzunterschiede zwischen VibF-Cy2 und anderen Cy-Domänen treten im Bereich der *core*-Motive Cy4 und Cy6 auf (siehe Abb. 7.14). In diesem Abschnitt finden sich neun Reste, die in allen Cy-Domänen, außer VibF-Cy2, konserviert sind. Die Inaktivität dieser besonderen Cy-Domäne in der Katalyse der Zyklisierung ist unter Umständen durch die Veränderung an diesen Positionen bedingt. Um den Einfluss auf die Heterozyklisierungsreaktion zu analysieren, wurden potentiell funktionelle Aminosäuren an sechs der neun Positionen für die Mutationsanalyse ausgewählt. An der Position 875 findet sich eine konservierter Threonin-Rest, der in VibF-Cy2 gegen Phenylalanin ausgetauscht ist (T875F). Die weiteren Unterschiede sind N900G, D919N, F920E und S984N. Ein besonderer Rest ist das Arginin906, da dieser Position in der VibF-Cy2-Sequenz keine Aminosäure zugeordnet werden konnte.

Ausgehend von Modellsystem BacA1-2-Te_{Tyc} konnten fünf Mutanten (BacA1-2-Te**T875A**, BacA1-2-Te**N900A**, BacA1-2-Te**R906A**, BacA1-2-Te**D919A** und BacA1-2-Te**S984A**) hergestellt werden, in denen die einzelnen Aminosäurereste im Bereich zwischen den *core*-Motiven Cy4 und Cy6 gegen Alanine ausgetauscht wurden (siehe Abb. 7.14).

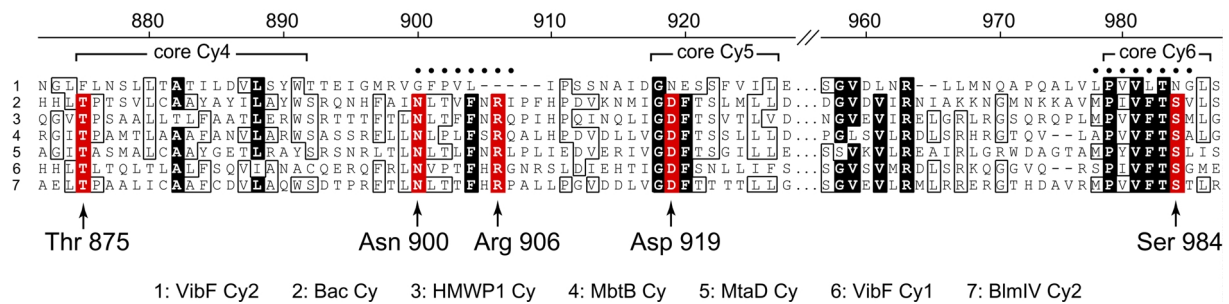


Abb. 7.15: Sequenzvergleich von Cy-Domänen. Gezeigt ist der Bereich der core-Motive Cy4 bis Cy6, in dem Einzelmutationen an fünf Positionen durchgeführt wurden (rot).

7.2.5.1 Enzymatische Aktivität der Cy-Domäne-Mutanten

Durch die Mutationen innerhalb der Cy-Domäne des Ausgangskonstrukts BacA1-2-Te_{Tyc} sollten die Einzelaktivitäten der A-Domänen sowie die Beladungsaktivität unbeeinflusst bleiben. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass, verglichen mit dem Modellsystem, in der Aktivierung und Bindung der Substrate keine Veränderungen auftreten. Alle Auswirkungen der Mutationen auf die Produktbildungsaktivität sind also ausschließlich Folge der veränderten Cy-Domänenreaktion.

Die fünf konstruierten Einzelmutanten zeigten unterschiedliche Eigenschaften in der Produktbildung. Aufgrund dieser Unterschiede lassen sie sich in drei Gruppen einteilen: i) unverändert im Vergleich zum Ausgangskonstrukt, ii) Bildung eines linearen Dipeptids und iii) keine Produktbildung.

i) Unveränderte Aktivität, verglichen mit dem Modellsystem, zeigte die Mutante BacA1-2-Te**D919A**. Beide Produkte, Ile-Cys_{Thiazolin} und Ile-Cys_{Thiazolin}-Cys, die auch vom Ausgangskonstrukt gebildet werden, wurden detektiert. Obwohl der Rest D919 Bestandteil des core-Motivs Cy5 ist und in allen Cy-Domänen - ausgenommen VibF-Cy2 - konserviert ist, scheint er weder in Kondensation- noch Zyklisierungsreaktion involviert zu sein. Möglicherweise besitzt der Rest D919A strukturelevante Eigenschaften, deren Fehlen aber in der Einzelmutante keine Auswirkungen zeigen.

ii) Die zweite und interessanteste Variante der Mutationsanalyse bilden die Enzyme BacA1-2-Te**N900A** und BacA1-2-Te**S984A**, da bei beiden Konstrukten lediglich die Zyklisierungsreaktion durch die Mutation betroffen ist. Inkubation mit den Substrataminosäuren führte zur Synthese des linearen Dipeptids Ile-Cys. Zusätzlich konnte ein weiteres Produkt der Reaktion als dimerisiertes Dipeptid (Ile-Cys)₂ identifiziert werden. Die Dimerisierung resultiert aus der Bildung einer Disulfidbrücke

zwischen den freien Thiolgruppen zweier Cystein-Seitenketten. Da nur das Dipeptid, welches durch eine Peptidbindung und nicht durch Kondensation der Seitenkette gebildet wurde, eine freie Thiolgruppe trägt, ist der Nachweis des Dimers ein direkter Beweis für die Katalyse der Peptidbindungsbildung durch die Cy-Domäne. Folglich findet tatsächlich zunächst die Bildung der Peptidbindung, gefolgt von der Heterozyklisierung, statt.

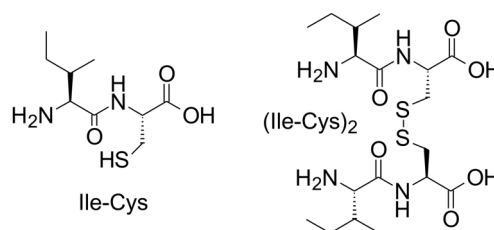


Abb. 7.16: Produkte der Mutanten BacA1-2-Te N900A und BacA1-2-Te S984A

Die Veränderungen in den Mutanten, BacA1-2-Te**N900A** und BacA1-2-Te**S984A**, führen also lediglich zu einer inaktivierten Heterozyklisierung. Diese Beobachtung unterstützt die Untersuchungen am Vib-System, wonach Kondensation und Zyklisierung zwei unabhängig voneinander erfolgende Reaktionen sind. Vorhersagen der Sekundärstruktur der Cy-Domäne und Vergleiche mit der Struktur der C-Domäne VibH [Keating et al., 2002] zeigen die Lokalisation des Restes N900 im β -Faltblatt 9 und die des S984 im β -Faltblatt 11. Beide Reste befinden sich also in der Region des Solventkanals, der als aktives Zentrum der C-Domäne beschrieben wurde. Offensichtlich wird die Heterozyklisierung im gleichen Solventkanal, allerdings von anderen Resten als die der Kondensationsreaktion, katalysiert.

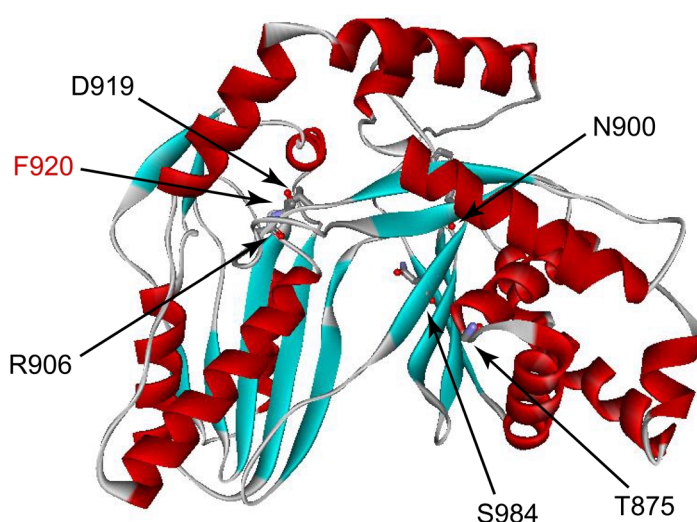


Abb. 7.17: Struktur der C-Domäne VibH [Keating et al., 2002]. Für die Cy-Domäne wurde eine der C-Domäne ähnliche Struktur vorhergesagt. Markiert sind die entsprechenden Positionen der in dieser Arbeit diskutierten Reste, die im Bereich der core-Motive Cy4 bis Cy6 in der VibF-Cy2 deutliche Veränderungen zeigen. Die Mutante F920A konnte nicht hergestellt werden (rot).

iii) Keine Produktbildung zeigten die Enzyme der dritten Gruppe (BacA1-2-Te**T875A** und BacA1-2-Te**R906A**). Beide Enzyme katalysierten weder die Zyklisierung noch die Kondensationsreaktion. Da die Verknüpfung der Substrate die Voraussetzung für die Bildung des Heterozyklus ist, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Mutationen der Reste T875 und R906 die Kondensationsreaktion betroffen ist.

Sequenzvergleiche zeigten 13 Aminosäurereste, die in C- und Cy-Domänen konserviert sind. Der einzige dieser Reste, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist R906. Allerdings haben frühere Untersuchungen gezeigt, dass die entsprechende Aminosäure der C-Domäne nicht an der Katalyse der Peptidbindungsbildung beteiligt ist [Bergendahl et al., 2002]. Aufgrund der Inaktivität der Mutante BacA1-2-Te**R906A** kann angenommen werden, dass R906 eher strukturelle als katalytische Relevanz besitzt. Ein Vergleich mit der Kristallstruktur des VibH lässt eine von R906 gebildete Wasserstoffbrücke innerhalb des Solventkanals, in dem sich das aktive Zentrum befindet, vermuten [Keating et al., 2002]. Wahrscheinlich verhindert die Mutation R906A die Bildung dieser Wasserstoffbrücke, wodurch strukturelle Änderungen eintreten, die im Enzym BacA1-2-Te**R906A** die Katalyse der Bindungsknüpfung verhindern.

Interessant ist, dass im Sequenzvergleich dem Rest R906 in der VibF-Cy2-Sequenz keine Aminosäure zugeordnet werden konnte. Im Bereich der *core*-Motive Cy4 und Cy5, in dem auch R 906 positioniert ist zeigen sich die deutlichsten Unterschiede zwischen VibF-Cy2 und anderen Cy-Domänen (siehe Abb.7.14). Möglicherweise besitzt diese besondere Domäne eine andere Organisation des Solventkanals, sodass trotz der Sequenzveränderungen die Kondensation katalysiert werden kann.

7.2.6 Der Reaktionsmechanismus der Cy-Domäne – Zusammenfassung und Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Modellsystem BacA1-2-Te_{Tyc} stellt ein geeignetes System für weitere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Cy-Domäne dar.

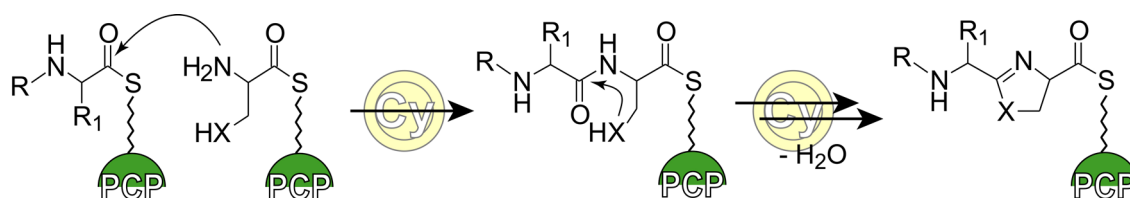


Abb. 7.18: Reaktionsabfolge der Cy-Domäne. Durch die Mutationsanalyse konnte die Bildung der Peptidbindung im ersten Schritt bewiesen werden. In den nachfolgenden Reaktionen erfolgen Zyklisierung und Dehydratisierung.

Durch die Analyse der Mutanten BacA1-2-Te**N900A** und BacA1-2-Te**S984A** konnte die Reaktionsabfolge in der Cy-Domäne nachgewiesen werden (siehe Abb. 7.18). Die Identifizierung des linearen Dipeptids Ile-Cys und des Dimers (Ile-Cys)₂ belegt die Bildung der Peptidbindung zwischen den Substraten, bevor die Heterozyklisierung der Seitenkette eintritt. In der Kondensationsreaktion besteht also die Verwandtschaft zwischen Cy- und C-Domänen. Diese Untersuchungen und die vorhergesagte strukturelle Ähnlichkeit der beiden Domänen-Typen [Keating et al., 2002] deuten darauf hin, dass es sich bei den Cy-Domänen um während der Evolution spezialisierte C-Domänen handelt.

Zwar konnte durch die Mutanten BacA1-2-Te**N900A** und BacA1-2-Te**S984A** die Peptidbildungsreaktion sowie die Unabhängigkeit dieser Peptidbildungsreaktion von der Zyklisierung nachgewiesen werden, für das Verständnis des Reaktionsmechanismus sind aber weitere Untersuchungen notwendig. So könnten durch die Mutationsanalyse der übrigen hochkonservierten Reste in den *core*-Motiven Cy4, Cy5 und Cy6 weitere, für die Katalyse wichtige Positionen identifiziert werden.

Durch die Mutationen der Aminosäuren N900 und S984 zu Alanin ist natürlich jede katalytische Funktion an den betroffenen Positionen ausgeschlossen. Austausche gegen verwandte Aminosäuren (Asp → Asn; Ser → Cys) können Aufschluss über eine tatsächliche Beteiligung dieser Reste an der Katalyse geben. So kann das BacA1-2-Te_{Tyc}-Modellsystem als Ausgangskonstrukt zur vollständigen Aufklärung des Reaktionsmechanismus dieser außergewöhnlichen modifizierenden Domäne dienen.

8 Anhang

8.1 Die konservierten *core*-Motive der NRPS-Domänen

Tabelle 8.1: *core*-Motive der NRPS-Domänen

| Domäne | <i>core</i> -Motiv | Konsensus-Sequenz |
|-------------------|--------------------|-----------------------------|
| A-Domäne | A1 | L(TS)YxEL |
| | A2 | LKAGxAYL(VL)P(LI)D |
| | A3 | LAYxxYTSG(ST)TGxPKG |
| | A4 | FDxS |
| | A5 | NxYGPTE |
| | A6 | GELxIxGx(VL)ARGYL |
| | A7 | Y(RK)TGDL |
| | A8 | GRxPxQVKIRGxRIELGEIE |
| | A9 | LPxYM(IV)P |
| | A10 | NGK(VL)DR |
| PCP-Domäne | T | LGG(DH)SL |
| C-Domäne | C1 | SxAQxR(LM)(WY)xL |
| | C2 | RHExLRTxF |
| | C3 | MHHxISDG(WV)S |
| | C4 | YxD(FY)AVW |
| | C5 | (IV)GxFVNT(QL)(CA)xR |
| | C6 | (HN)QD(YD)PFE |
| | C7 | RDxSRNPL |
| Cy-Domäne | Cy1 | FPL(TS)xxQxAYccGR |
| | Cy2 | RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ |
| | C3' | DxxxxDxxS |
| | Cy3 | LPxxPxLPLxxxP |
| | Cy4 | (TS)(PA)xxx(LAF)6x(IVT)LxxW |
| | Cy5 | (GA)DFTxLxLL |
| | Cy6 | PVVFTSxL |
| Ox-Domäne | Cy7 | (ST)(QR)TPQVx(LI)D13xWD |
| | Ox1 | KYxYxSxGxxY(PG)VG |
| | Ox2 | GxxxG(LV)xxGxYYY(HD)P |
| M-Domäne | M1 | VL(DE)xGxGxG |
| | M2 | NELSxYRYxAV |
| | M3 | VEsSxARGxGxLD |

| Domäne | core-Motiv | Konsensus-Sequenz |
|------------------|------------|------------------------|
| E-Domäne | E1 | PIQxWF |
| | E2 | HHxISDG(WV)S |
| | E3 | DxLLxAxG |
| | E4 | EGHGRE |
| | E5 | RTVGWFTxxYP(YV)PFE |
| | E6 | PxxGxGYG |
| | E7 | FNYLG(QR) |
| Te-Domäne | TE | GxSxG |
| R-Domäne | R1 | V(LF)LTGATGFLGAXLLxxLL |
| | R2 | VYCLVRA |
| | R3 | GDLxxPxLGLS |
| | R4 | NVxGT |
| | R5 | GYxQSKWVAExxVxxAxxRGL |
| | R6 | GFLxxP |

8.2 Der nichtribosomale Code

Tabelle 8.2: Selektivität vermittelnder NRPS-Code der A-Domänen

| Sequenz | Position | | | | | | | | | | | Herkunft |
|-----------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| | 235 | 236 | 239 | 278 | 299 | 301 | 322 | 330 | 331 | 332 | 517 | |
| 3-hPip | N | F | C | S | Q | G | V | L | T | F | K | SnbA |
| 3-MeAsp | D | A | R | H | V | G | I | F | V | K | K | McyB2 |
| 3-MeGlu | D | Q | G | K | T | G | V | G | H | C | K | CDA3.1 |
| 3-pAsp | D | A | T | K | V | G | E | V | G | C | K | CDA2.3 |
| 4-Mha | N | M | M | Y | V | G | V | L | I | A | K | AcmA |
| 4-oPip | D | F | Q | F | L | G | V | A | V | T | K | SnbDE3 |
| Aad (1) | E | P | R | N | I | V | E | F | V | T | K | AcvA1 |
| Aad (2) | D | P | R | H | F | V | M | R | S | V | K | Lys1+, Lys2 |
| Abu (1) | D | A | W | F | H | A | V | A | Y | S | K | CssA6 |
| Abu (2) | D | T | Y | W | W | G | G | T | F | A | K | SnbC2 |
| Aeo | D | V | L | L | C | T | G | I | M | S | K | Hts1.4 |
| AHBA | S | L | A | A | L | G | A | G | A | I | K | RifA |
| Ahp | D | V | E | N | A | G | V | V | T | A | K | ApdB2 |
| Ala (1) | D | L | F | N | N | A | L | T | Y | A | K | BlmIX, MycA2 |
| Ala (2) | D | V | F | I | Y | A | A | I | L | S | K | CssA11 |
| Ala (3) | D | V | W | C | I | A | A | I | Y | A | K | Mps3 |
| Ala (4) | D | A | G | G | C | A | M | V | A | C | K | Hts1.2 |
| Ala (5) | D | L | F | V | C | G | G | P | L | G | K | Cps1.1 |
| Ala (6) | D | M | I | S | A | C | C | L | I | V | K | SafB1 |
| alloThr | D | Y | W | S | V | G | M | V | H | A | K | Mps2 |
| Arg (1) | D | V | W | T | I | G | A | V | D | A | K | McyC |
| Arg (2) | D | V | A | D | V | G | A | I | D | S | K | SyrE5 |
| Asn | D | L | T | K | I | G | E | V | G | C | K | BacC5, BlmVI2, BlmX1, CepA3, MycA, MycB2, MycC2, TycC1, BacC5, LchAB2, LicB2, SrfAB2 |
| Asp (1) | D | L | T | K | V | G | H | I | G | A | K | CDA1.4, CDA1.5, CDA2.1 |
| Asp (2) | D | L | T | P | I | G | A | V | N | I | K | BlmIV.1 |
| β-Ala (1) | V | D | W | V | I | S | L | A | D | A | K | FxbB2 |
| β-Ala (2) | D | G | T | L | I | S | S | G | D | V | K | CssA5 |
| Bmt | D | A | W | T | Y | G | G | V | I | S | K | AcvA2 |
| Cys (1) | D | H | E | S | D | V | G | I | T | T | K | AngR, BacA2, BlmIV.2, EpoP, HMWP2, PchE, PchF |
| Cys (2) | D | L | Y | N | L | S | L | I | W | S | K | SyrE3 |
| Dab | D | L | E | H | N | T | T | V | S | C | K | CssA1 |
| D-Ala (1) | D | L | W | F | Y | I | A | V | V | S | K | Dael |
| D-Ala (2) | D | L | M | V | L | C | T | V | A | V | K | Glg1.1 |
| D-Ala (3) | D | L | M | C | Y | D | A | V | A | L | K | Hts1.1 |
| D-Ala (4) | D | L | L | F | G | I | S | V | L | V | K | SyrE4 |
| D-Dab | D | L | E | T | N | T | T | V | S | C | K | CepA1 |
| D-Leu | D | A | F | Y | L | G | M | M | C | A | K | SyrE2 |
| D-Ser | D | V | W | H | L | S | L | I | D | V | K | DhbE, EntE, MyxE, VibE |
| DHB | N | Y | S | A | Q | G | V | V | N | Y | K | CepC |
| Dh-Phg | D | P | Y | H | G | G | T | L | C | A | K | SyrE7 |
| Dh-Thr | D | F | W | N | V | G | M | V | H | A | K | SnbDE2, SnbDE2 ^{Sv} |
| (Ac)DMAP | D | A | W | T | I | A | A | V | C | A | K | PhsA |
| DMPt | G | F | A | Y | Y | G | G | L | T | R | K | LchAA1, LicA1, MycB3 |
| Gln (1) | D | A | Q | D | L | G | V | V | D | A | K | ApdA1, TycC2 |
| Gln (2) | D | A | W | Q | F | G | G | V | D | A | K | SrfAA1, BacA4 |
| Glu (1) | D | A | K | D | L | G | V | V | D | A | K | |

| Sequenz | Position | | | | | | | | | | | Herkunft |
|----------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------------------------------------------|
| | 235 | 236 | 239 | 278 | 299 | 301 | 322 | 330 | 331 | 332 | 517 | |
| Glu (2) | D | A | W | H | F | G | G | V | D | A | K | FenA2, FenC1, FenE1, PPS1.1, PPS3.1, PPS4.2 |
| Gly (1) | D | I | L | Q | L | G | L | I | W | S | K | AcnC2, CDA2.2, Dhbf, NosC2, TA1 |
| Gly (2) | D | I | Q | M | F | V | A | M | Q | S | K | CssA7 |
| Gly (3) | D | L | F | N | N | A | L | T | Y | S | K | SafB2 |
| HAsp | D | M | I | D | L | G | M | V | D | A | K | SyrE8 |
| His (1) | D | S | E | L | T | A | E | V | C | S | K | BacC3 |
| His (2) | D | S | A | L | I | A | E | V | W | S | K | BlmX.2 |
| Hiv | G | A | L | H | V | V | G | S | I | C | K | EsynA1 |
| Homo-Tyr | D | L | A | F | S | G | A | V | A | A | K | ApdB1 |
| hPhg (1) | D | V | Y | H | L | G | L | L | C | V | K | CDA1.6 |
| hPhg (2) | D | I | F | H | T | G | L | L | C | A | K | CepB1, CepB2 |
| Ile (1) | D | A | F | F | L | G | V | T | F | A | K | ApdD, NosA1 |
| Ile (2) | D | G | F | F | L | G | V | V | Y | A | K | BacA1, BacA5, BacC1, LchAC, LicC |
| Ile (3) | D | A | F | F | Y | G | I | T | F | S | K | PPS5.1, FenB1 |
| Ile (4) | D | A | F | T | N | C | G | V | F | S | K | CmaA |
| Leu (1) | D | A | W | F | L | G | N | V | V | A | K | BacA3, LchAA3, LchAB3, LicA3, LicB3, MycB1, NosA4, NosC1, SrfAA3, SrfAB3 |
| Leu (2) | D | A | W | L | Y | G | A | V | M | S | K | CssA2, CssA3, CssA8, CssA10 |
| Leu (3) | D | G | A | Y | T | G | E | V | V | T | K | GrsB4, TycC6 |
| Leu (4) | D | A | F | M | L | G | M | V | F | T | K | LchAA2, LicA2, SrfAA2 |
| Leu (5) | D | A | F | F | L | G | C | V | F | A | K | SrfAC |
| Lys (1) | D | A | E | S | I | G | S | V | C | A | K | BacB1 |
| Lys (2) | D | V | A | H | P | G | F | I | N | A | K | MbtE |
| Lys (3) | D | A | W | D | A | G | C | V | E | A | K | MbtF |
| Lys (4) | D | A | E | D | I | G | T | V | V | A | K | MyxG |
| MdhA | D | V | W | H | F | S | L | I | D | V | K | McyA1 |
| Me-Pro | D | V | Q | F | I | A | H | L | A | T | K | NosA3 |
| Orn (1) | D | V | G | E | I | G | S | I | D | S | K | BacB2, FenC2, GrsB3, PPS1.2, TycC5 |
| Orn (2) | D | I | N | Y | W | G | G | I | G | V | K | FxbB1 |
| Orn-(δ) | D | M | E | N | L | G | L | I | N | T | K | FxbC1, FxbC3 |
| Phe (1) | D | A | F | T | V | A | A | V | C | A | K | BacC2 |
| Phe (2) | D | A | W | T | I | A | A | I | C | A | K | GrsA, TycA |
| Phe (3) | D | A | W | T | A | V | A | I | C | V | K | Mps1 |
| Phe (4) | D | A | P | I | M | G | G | T | C | A | K | SyrE6 |
| Phe (5) | D | A | L | V | M | G | A | V | M | A | K | TycB2 |
| Phe (6) | D | A | W | T | I | A | A | V | C | A | K | TycB3 |
| Phg | D | I | F | L | W | G | L | L | G | C | K | SnbDE4 |
| Pip | D | Y | Q | Y | C | G | H | L | I | T | K | FkbP, RapP |
| Pro (1) | D | V | Q | F | A | A | H | V | V | T | K | AcnC1, MycB4, SnbDE1, VirgA1 |
| Pro (2) | D | V | Q | F | I | A | H | V | V | T | K | FenA1, GrsB1, MycB4, NosD2, PPS4.1, TycB1 |
| Pro (3) | D | I | A | V | I | T | V | L | I | T | K | Hts1.1 |
| Sal | N | F | C | A | Q | G | V | L | C | F | K | MbtA, PchA, YbtE |
| Ser | D | V | W | H | F | S | L | V | D | V | K | BlmV1.1, CDA1.1, EntF, MycC1, NosA2, SyrE1, |
| Ser/Thr | D | M | L | N | A | G | L | V | H | A | K | MbtB |
| Thr (1) | D | F | W | N | I | G | M | V | H | V | K | AcnC1, ApdA2,B3, CDA1.2, FenD2, FxbC2 PPS2.2, PyoD1,2, SnbC1 |
| Thr (2) | D | F | W | S | L | G | M | I | H | V | K | BlmVII |
| Thr (3) | D | I | L | Q | L | G | L | I | W | S | K | DhbF1 |

| Sequenz | Position | | | | | | | | | | | Herkunft |
|---------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------------------------------------|
| | 235 | 236 | 239 | 278 | 299 | 301 | 322 | 330 | 331 | 332 | 517 | |
| Thr (4) | D | F | W | S | A | R | M | V | H | T | K | SyrB |
| Thr (5) | D | L | T | V | A | G | L | I | W | S | K | DhbF |
| Thr (6) | D | V | W | H | L | S | L | V | D | V | K | Micx.x |
| Trp | D | A | W | S | V | G | S | V | C | S | K | CDA1.3, CDA3.2 |
| Tyr (1) | D | A | S | T | I | A | A | V | C | A | K | ApdB4, NosD1 |
| Tyr (2) | D | A | S | T | L | G | A | I | C | S | K | CepB3 |
| Tyr (3) | D | T | S | K | V | A | A | I | C | A | K | CepA2 |
| Tyr (4) | D | G | T | I | T | A | E | V | A | T | K | FenA3, FenD1, PPS2.1, PPS4.3 |
| Tyr (5) | D | A | L | T | T | G | E | V | V | A | K | MycB1, TycC3 |
| Tyr (6) | D | I | L | Q | L | G | L | V | W | S | K | SafA1 |
| Tyr (7) | D | P | W | G | L | G | L | I | D | A | K | SafA2 |
| Val (1) | D | A | Y | F | W | G | V | T | F | A | K | AcmB2, AcmC3 |
| Val (2) | D | F | E | S | T | A | A | V | Y | N | K | AcvA3 |
| Val (3) | D | A | W | M | F | A | A | I | L | S | K | CssA4, CssA9 |
| Val (4) | D | G | W | F | I | G | I | I | I | S | K | EsynA2 |
| Val (5) | D | A | F | W | I | G | G | T | F | S | K | FenE2, GrsB2, LchAB1, LicB1, PPS3.2, SrfAB1, TycC4 |

variable Positionen sind rot markiert

Abkürzungen nichtproteinogener Aminosäuren und Hydroxy-Carbonsäuren:

4-MHA, 4-Methyl-3-Hydroxy-Anthrallinat; Aad, Amino adipin-Säure; Abu, 4-Amino-Butyrat; AcDMPT, *N*-Acetyl-Demethyl-Phosphothricin; Aeo, 2-Amino-8-Oxo-9,10-Epoxy-Decansäure; AHBA, 3-Amino-5-Hydroxy-Benzoat; Ahp, 3-Amino-6-Hydroxy-2-Piperidon; Bmt, 4-(2-Butenyl)-4-Methyl-Threonin; Dab, 2,4-Diamino-Butyrat; DHB, 2,3-Dihydroxybenzoat; Dh-Thr, Dehydro-Threonin; DhPhg, 2,4-Dihydroxy-Phenylglycin; DMAP, 4-Dimethylamino-Phenylalanin; DMPT, Demethyl-Phosphothricin; HAsp, β -Hydroxy-Aspartat; Hiv, 2-Hydroxy-Isovalerat; hPhg, 4-Hydroxy-Phenylglycin; MdhA, *N*-Methyl-Dehydro-Alanin; Phg, Phenylglycin; Pip, Pipecolat; Sal, Salicylat.

8.3 Biosynthesesysteme

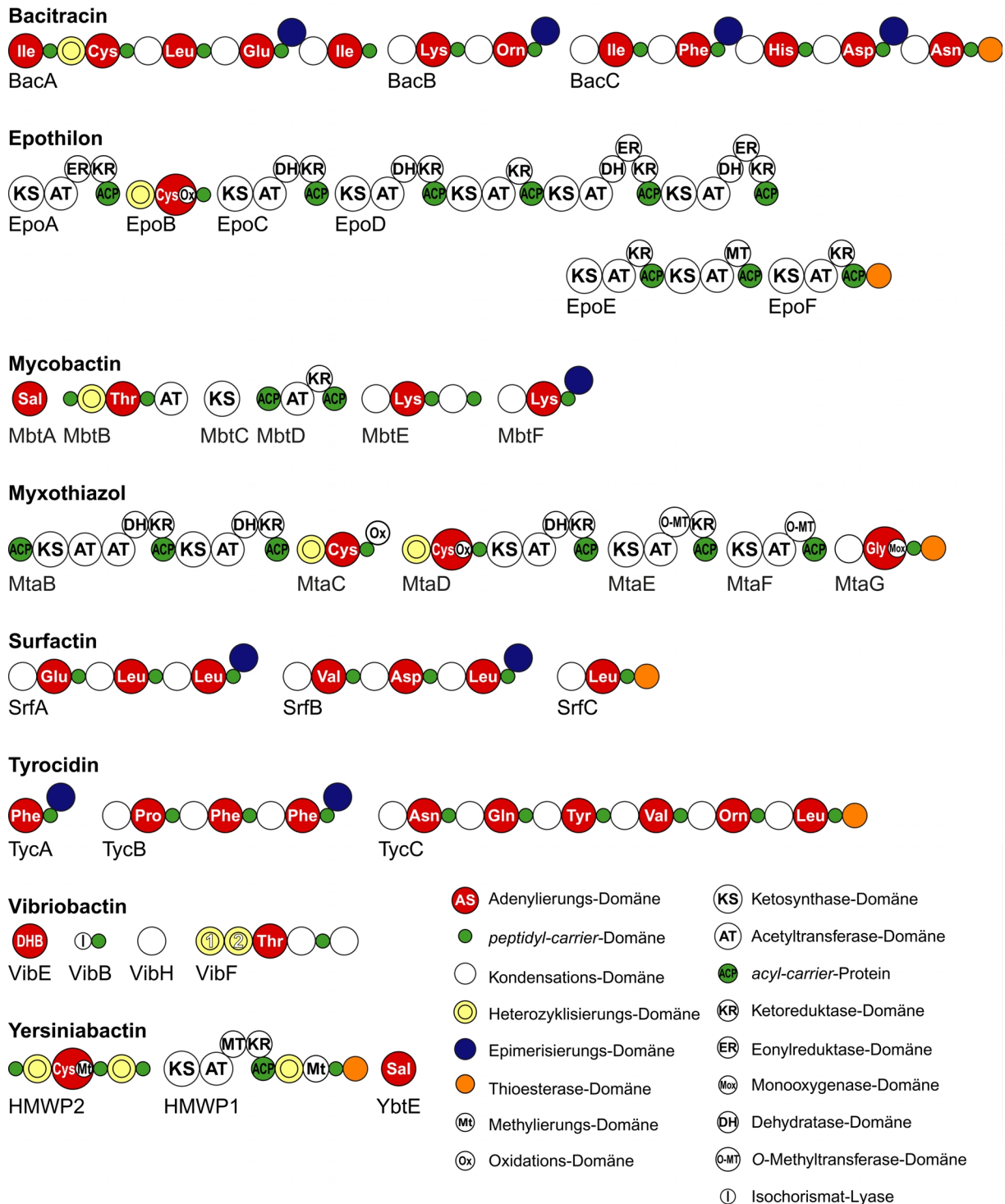


Abb. 8.1: Biosynthesesysteme. Gezeigt sind die Systeme des Bacitracin aus *Bacillus licheniformis*, Epothilon (*Sorangium cellulosum*), Mycobactin (*Mycobacterium tuberculosis*), Myxothiazol (*Stigmatella aurantiaca*), Surfactin (*Bacillus subtilis*), Tyrocidin (*Bacillus brevis*), Vibriobactin (*Vibrio cholerae*) und Yersiniabactin (*Yersinia pestis*).

8.4 Oligonukleotide

Tabelle 8.3: Oligonukleotide für die Konstruktion der Asp-Phe-Synthetasen

| Bezeichnung | Sequenz |
|----------------------|--------------------------------------------------------|
| 5'AspLeu(Sph)srfB2 | 5'- TAA GCA TGC TGC TTT CAT CTG CAG AAA C -3' |
| 3'AspLeu(BamHI)srfB3 | 5'- AAT GGA TCC TTC GGC ACG CTC TAC -3' |
| 5' (BstEII)TycA | 5'- ATT TGG TCA CCA ATC TCA TCG ACA A -3' |
| 3'TycA(BamHI) | 5'- ATA GGA TCC TGT ATT CGT AAA GTT TTT C -3' |
| 5'TesrfC1(ClaI) | 5'- ATA ATC GAT AAT CGC ACA AAT ATG GTC -3' |
| 3'int.srf-Te(BglII) | 5'- ATA AGA TCT AAC CGT TAC GGT TTG TGT -3' |
| 5'srfB2-A (NcoI) | 5'- TAA CCA TGG TGC TTT CAT CTG CAG AAA C -3' |
| 3'srfB2-T (EcoRV) | 5'- TAT GAT ATC CTC CAT ATA AGC CGC -3' |
| 5'srfC-T (HpaI) | 5'- TAT GTT AAC TGG ATT GGA CCG CGG AAC -3' |
| 3'srfC-Te (BamHI) | 5'- TAT GGA TCC TGA AAC CGT TAC GGT TTG TG -3' |
| 5'tycC6-T (HpaI) | 5'- TAT GTT AAC GAA TAC GTG GCC CCG AG -3' |
| 3'tycC6-T (BamHI) | 5'- TAT GGA TCC GAA ATC GGC CAC CTT TTC G -3' |
| 3'srfB2-T (BamHI) | 5'- TAT GGA TCC CTC CAT ATA AGC CGC -3' |
| 3'tycB2-T (BglII) | 5'- AAT AGA TCT TTC GAT CAA GCG GGC CAA G -3' |
| 5'tycC6-Te (BglII) | 5'- TAA AGA TCT GCC ATT TTG TTA AAT CAG -3' |
| 3'tycC6-Te (BamHI) | 5'- TAT GGA TCC TTT CAG GAT GAA CAG TTC TTG -3' |
| 5'tycB2-A (BstEII) | 5'- ATA GGT CAC CGC GCA TGA GAA GCA G -3' |
| 3'tycB2-T (BamHI) | 5'- AAT GGA TCC TTC GAT CAA GCG GGC C -3' |

Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind in fett hervorgehoben.

Tabelle 8.4: Oligonukleotide des Cy-Domänen-Projekts

| Bezeichnung | Sequenz |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 5'bacA1-A (NcoI) | 5'- TAT ACC ATG GTT GCT AAA CAT TCA TTA G -3' |
| 3'bacA2-T (BglII) | 5'- TTA AGA TCT GTT TTT CAA ATA GTG GTC C -3' |
| 3'bacA1-T (BamHI) | 5'- TAT GGA TCC TTC GAT AAA AGC GCT CAA TTC -3' |
| 3'bacA2-Cy (BamHI) | 5'- ATA GGA TCC GGC TTT CTG GAT GAC AG -3' |
| 5'tycTe (BglII) | 5'- ATA AGA TCT CAT AAG CGC TTT GAG AGC AG -3' |
| 3'tycTe (BamHI) | 5'- TAT GGA TCC TTT CAG GAT GAA CAG TTC TTG -3' |
| 5'mbtB-A (BglII) | 5'- AAT AGA TCT GGG GAC GAC GCC TGG G -3' |
| 5'mbtB-Cy (BglII) | 5'- ATA AGA TCT ACC GGC GTC GCG CCC AC -3' |
| 3'mbtB-T (BglII) | 5'- AAT AGA TCT GGT GAG CAA CTG GGC CAA CG -3' |
| 5'mtaD-A (BglII) | 5'- TAT AGA TCT GAT GCC TCG GCG TGG G -3' |
| 5'mtaD-Cy (BglII) | 5'- ATT AGA TCT CGC TCC GCG AAT CTT CAG -3' |
| 3'mtaD-T (BglII) | 5'- ATA AGA TCT GTG GAT GAA CTC CGC CAG -3' |
| CyT875A | 5'-CGG CAT CAT CAT CTC <u>GCA</u> CCG ACT TCC GTC CTT TG-3' |
| CyT875Arev | 5'-CAA AGG ACG GAA GTC <u>GGT</u> <u>GCG</u> AGA TGA TGA TGC CG-3' |
| CyN900A | 5'-CGG CAA AAT CAT TTT GCT ATC <u>GCG</u> TTA ACC GTA TTT AAC AGA ATC CCG-3' |
| CyN900Arev | 5'-CGG GAT TCT GTT AAA TAC GGT TAA <u>CGC</u> GAT AGC AAA ATG ATT TTG CCG-3' |
| CyR906A | 5'-GCT ATC AAT TTA ACC GTA TTT AAC <u>GCG</u> ATC CCG TTT CAT CCG GAT GTC AAG-3' |
| CyR906Arev | 5'-CTT GAC ATC CGG ATG AAA CGG GAT <u>CGC</u> GTT AAA TAC GGT TAA ATT GAT AGC-3' |
| CyD919A | 5'-GGA TGT CAA GAA CAT GAT CGG <u>AGC</u> <u>CTT</u> TAC CTC TTT AAT GCT GCT GG-3' |
| CyD919Arev | 5'-CCA GCA GCA TTA AAG AGG TAA <u>AGG</u> <u>CTC</u> CGA TCA TGT TCT TGA CAT CC-3' |
| CyS984A | 5'-GCC GAT CGT ATT CAC <u>AGC</u> <u>TGT</u> GCT GAT TGA AAA TCC C-3' |
| CyS984Arev | 5'-GGG ATT TTC ACT CAG CAC <u>AGC</u> <u>TGT</u> GAA TAC GAT CGG C-3' |

Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind in fett hervorgehoben. Bei den Oligonukleotiden für die Mutagenese sind veränderte Basen kursiv hervorgehoben, die betroffenen Codons sind unterstrichen.

8.5 Hybride Peptidsynthetasen

Tabelle 8.5: In dieser Arbeit hergestellte und charakterisierte Hybridsynthetasen

| Bezeichnung | Domänenorganisation |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Asp-Phe-I | [A-PCP-C] _{SrfB2-3} -[A] _{TycA} -[PCP-Te] _{SrfC} |
| Asp-Phe-II | [A-PCP] _{SrfB2} -[C-A] _{TycB2} -[PCP-Te] _{SrfC} |
| Asp-Phe-III | [A-PCP] _{SrfB2} -[C-A] _{TycB2} -[PCP-Te] _{TycC6} |
| Asp-Phe-IV | [A-PCP] _{SrfB2} -[C-A] _{TycB2} -[PCP] _{TycC6} |
| Asp-Phe-V | [A-PCP] _{SrfB2} -[C-A-PCP] _{TycB2} -[Te] _{TycC6} |
| Asp-Phe-VI | [A-PCP-C] _{SrfB2-3} -[A-PCP] _{TycB2} -[Te] _{TycC6} |
| BacA1-2-Te _{Tyc} | [A-PCP-Cy-A-PCP] _{BacA1-2} -[Te] _{TycC6} |
| BacA1-2-Te _{Srf} | [A-PCP-Cy-A-PCP] _{BacA1-2} -[Te] _{SrfC} |
| BacA1-2-Te _{Yer} | [A-PCP-Cy-A-PCP] _{BacA1-2} -[Te] _{Yer} |
| Bac-Mbt-I | [A-PCP] _{BacA1} -[Cy-A-PCP] _{MbtB} -[Te] _{TycC6} |
| Bac-Mbt-II | [A-PCP-Cy] _{BacA1-2} -[Cy-A-PCP] _{MbtB} -[Te] _{TycC6} |
| Bac-Mta-I | [A-PCP] _{BacA1} -[Cy-A(Ox)-PCP] _{MtaD} -[Te] _{TycC6} |
| Bac-Mta-II | [A-PCP-Cy] _{BacA1-2} -[A(Ox)-PCP] _{MtaD} -[Te] _{TycC6} |
| BacA1-2-Te T875A | [A-PCP-Cy*-A-PCP] _{BacA1-2} -[Te] _{TycC6} |
| BacA1-2-Te N900A | [A-PCP-Cy*-A-PCP] _{BacA1-2} -[Te] _{TycC6} |
| BacA1-2-Te R906A | [A-PCP-Cy*-A-PCP] _{BacA1-2} -[Te] _{TycC6} |
| BacA1-2-Te D919A | [A-PCP-Cy*-A-PCP] _{BacA1-2} -[Te] _{TycC6} |
| BacA1-2-Te S984A | [A-PCP-Cy*-A-PCP] _{BacA1-2} -[Te] _{TycC6} |

Abkürzungen der Domänen:

- A, Adenylierungs-Domäne
- PCP, *petidyl-carrier*-Protein
- C, Kondensations-Domäne
- Cy, Hetrozyklisierungs-Domäne
- Te, Thioesterase-Domäne

Abkürzungen der Biosynthesesysteme:

- Bac, Bacitracin (*Bacillus licheniformis* ATCC 10716)
- Srf, Surfactin (*Bacillus subtilis* ATCC 21332)
- Tyc, Tyrocidin (*Bacillus brevis* ATCC 8185)
- Mbt, Mycobactin (*Mycobacterium tuberculosis*)
- Mta, Myxothiazol (*Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1)
- Yer, Yersiniabactin (*Yersinia pestis*)

Domänen, die in ihren Ursprungssystemen Einheiten bilden, sind in eckigen Klammern zusammengefasst. Die Indizes geben das Ursprungssystem an. Durch gerichtete Mutationen veränderte Cy-Domänen sind mit „*“ markiert.

9 Literatur

- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K. & Campos-Takaki, G.M. (1993) Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, **42**, 1-7.
- Belshaw, P.J., Roy, R.S., Kelleher, N.L. & Walsh, C.T. (1998) Kinetics and regioselectivity of peptide-to-heterocycle conversions by microcin B17 synthetase. *Chem Biol*, **5**, 373-384.
- Belshaw, P.J., Walsh, C.T. & Stachelhaus, T. (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science*, **284**, 486-489.
- Bennett, J. & Scott, K.J. (1971) Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem*, **43**, 173-182.
- Bergendahl, V., Linne, U. & Marahiel, M.A. (2002) Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem*, **269**, 620-629.
- Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B. & Muller, R. (1999) Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim Biophys Acta*, **1445**, 185-195.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bruner, S.D., Weber, T., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T. & Stubbs, M.T. (2002) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure (Camb)*, **10**, 301-310.
- Brunner, R. (1965) Polypeptide. In *Antibiotika*. Verlag Carl, Nürnberg, Deutschland.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T. & Dobberstein, B. (1987) A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **155**, 416-433.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E. coli* strain with beta- galactosidase selection. *Biotechniques*, **5**, 376-379.
- Bush, K. & Mobashery, S. (1998) How beta-lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. From mechanistic knowledge to clinical circumvention. *Adv Exp Med Biol*, **456**, 71-98.
- Cane, D.E. & Walsh, C.T. (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **6**, R319-325.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. & Khosla, C. (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science*, **282**, 63-68.
- Casqueiro, J., Gutierrez, S., Banuelos, O., Fierro, F., Velasco, J. & Martin, J.F. (1998) Characterization of the *lys2* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding alpha-aminoadipic acid reductase. *Mol Gen Genet*, **259**, 549-556.

- Chambers, H.F.** (1987) Coagulase-negative staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob Agents Chemother*, **31**, 1919-1924.
- Conti, E., Franks, N.P. & Brick, P.** (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, **4**, 287-298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. & Brick, P.** (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J*, **16**, 4174-4183.
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B. & Kosaric, N.** (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 408-412.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. & van Sinderen, D.** (1993) Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **8**, 821-831.
- Crosa, J.H. & Walsh, C.T.** (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 223-249.
- Crump, M.P., Crosby, J., Dempsey, C.E., Parkinson, J.A., Murray, M., Hopwood, D.A. & Simpson, T.J.** (1997) Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry*, **36**, 6000-6008.
- de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C. & Grandi, G.** (1997) Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J Biol Chem*, **272**, 25304-25309.
- Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1995) Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett*, **357**, 212-216.
- Dieckmann, R., Pavela-Vrancic, M., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1999) Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase 1. *J Mol Biol*, **288**, 129-140.
- Diez, B., Gutierrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H. & Martin, J.F.** (1990) The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the pcbAB gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the pcbC and penDE genes. *J Biol Chem*, **265**, 16358-16365.
- Doekel, S.** (2000) Synthese von Dipeptiden an hybriden Peptidsynthetasen. *Dissertation, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität, Marburg (Lahn)*.
- Doekel, S. & Marahiel, M.A.** (2000) Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem Biol*, **7**, 373-384.
- Doekel, S., Marahiel, M.A., Quaedflieg, P.J.L., Sonke, T.** (2000) Microbiological production method for alpha-L-aspartyl-L-phenylalanine. Patent WO-00/58478
- Du, L., Chen, M., Sanchez, C. & Shen, B.** (2000) An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiol Lett*, **189**, 171-175.
- Ehmann, D.E., Gehring, A.M. & Walsh, C.T.** (1999) Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-aminoadipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry*, **38**, 6171-6177.

- Ehmann, D.E., Trauger, J.W., Stachelhaus, T. & Walsh, C.T. (2000) Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **7**, 765-772.
- Elsner, A., Engert, H., Saenger, W., Hamoen, L., Venema, G. & Bernhard, F. (1997) Substrate specificity of hybrid modules from peptide synthetases. *J Biol Chem*, **272**, 4814-4819.
- Eppelmann, K., Doekel, S. & Marahiel, M.A. (2001) Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **11**, 11.
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A. (2002) Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry*, **41**, 9718-9726.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347**, 203-206.
- Farabough, P.J. (1978) Sequence of the *lacI* gene. *Nature*, **274**, 765-769.
- Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schobert, M., Schafer, A., Jahn, D. & Marahiel, M.A. (2002) Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, **277**, 50293-50302.
- Flemming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Path.*, **10**, 226-236.
- Gaitatzis, N., Kunze, B. & Muller, R. (2001) In vitro reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11136-11141.
- Gehring, A.M., DeMoll, E., Fetherston, J.D., Mori, I., Mayhew, G.F., Blattner, F.R., Walsh, C.T. & Perry, R.D. (1998a) Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem Biol*, **5**, 573-586.
- Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D. & Walsh, C.T. (1998b) The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry*, **37**, 17104-17111.
- Gentz, R. & Bujard, H. (1985) Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5. *J Bacteriol*, **164**, 70-77.
- Gocht, M. & Marahiel, M.A. (1994) Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol*, **176**, 2654-2662.
- Grodberg, J. & Dunn, J.J. (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, **170**, 1245-1253.
- Haavik, H.I. & Froyshov, O. (1975) Function of peptide antibiotics in producer organisms. *Nature*, **254**, 79-82.
- Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M. & Zocher, R. (1993) Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol Microbiol*, **7**, 905-914.

- Hill, J.B. & Gelman, Y. (1990) Process for the preparation of a alpha-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester hydrochloride by use of isolated N-formyl-L-aspartic anhydride. *US-Patent*, US-A-4,946,988.
- Hubbard, B.K. & Walsh, C.T. (2003) Vancomycin Assembly: Nature's Way. *Angew Chem Int Ed*, **42**, 730-765.
- Hutchinson, C.R. (2003) Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: Falling together by coming apart. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ikai, Y., Oka, H., Hayakawa, J., Harada, K.I. & Suzuki, M. (1992) Structural characterization of bacitracin components by Fast-atom bombardment (FAB) liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). *J Antibiot (Tokyo)*, **45**, 1325-1334.
- Irino, S., Oyama, K., Nakamura, S.-I., Van Dooren, T.J. & Qaedflieg, P.J.L. (1994) Enzymatic coupling of L-phenylalanine methyl ester and N-benzyloxycarbonyl-aspartic acid. *Europäisches Patent*, EP0664338.
- Ishihara, H. & Shimura, K. (1979) Thiazoline ring formation in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett*, **99**, 109-112.
- Ishihara, H. & Shimura, K. (1988) Further evidence for the presence of a thiazoline ring in the isoleucylcysteine dipeptide intermediate in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett*, **226**, 319-323.
- Johnson, B.A., Anker, H. & Meleney, F.L. (1945) Bacitracin: A new antibiotic produced by a member of the B. subtilis group. *Science*, **102**, 376-377.
- Keating, T.A., Marshall, C.G. & Walsh, C.T. (2000) Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry*, **39**, 15522-15530.
- Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T. & Keating, A.E. (2002) The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol*, **9**, 522-526.
- Keating, T.A. & Walsh, C.T. (1999) Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 598-606.
- Kessler, N. & Marahiel, M.A. (2003) unveröffentlicht.
- Kim, M.Y., Vankayalapati, H., Shin-Ya, K., Wierzbka, K. & Hurley, L.H. (2002) Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular G-quadruplex. *J Am Chem Soc*, **124**, 2098-2099.
- Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. (2001) Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, **40**, 7099-7108.
- Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K. & Marahiel, M.A. (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol*, **4**, 927-937.
- Konz, D. & Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol*, **6**, R39-48.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol*, **3**, 923-936.
- Lee, S.G. & Lipmann, F. (1975) Tyrocidine synthetase system. *Methods Enzymol.*, **43**, 585-602.

- Linne, U., Doekel, S. & Marahiel, M.A. (2001) Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, **40**, 15824-15834.
- Linne, U. & Marahiel, M.A. (2000) Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry*, **39**, 10439-10447.
- Losey, H.C., Peczu, M.W., Chen, Z., Eggert, U.S., Dong, S.D., Pelczer, I., Kahne, D. & Walsh, C.T. (2001) Tandem action of glycosyltransferases in the maturation of vancomycin and teicoplanin aglycones: novel glycopeptides. *Biochemistry*, **40**, 4745-4755.
- Luo, L., Kohli, R.M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. (2002) Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. *Biochemistry*, **41**, 9184-9196.
- Makinen, K.K. (1972) Inhibition by bacitracin of some hydrolytic enzymes. *Int J Protein Res*, **4**, 21-28.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, H.D. (1997) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem. Rev.*, **97**, 2651-2673.
- Marshall, C.G., Burkart, M.D., Keating, T.A. & Walsh, C.T. (2001) Heterocycle formation in vibriobactin biosynthesis: alternative substrate utilization and identification of a condensed intermediate. *Biochemistry*, **40**, 10655-10663.
- Marshall, C.G., Hillson, N.J. & Walsh, C.T. (2002) Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF. *Biochemistry*, **41**, 244-250.
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A. & Stubbs, M.T. (2002) Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12120-12125.
- May, J.J., Wendrich, T.M. & Marahiel, M.A. (2001) The dhb operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem*, **276**, 7209-7217.
- Miller, D.A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T.A. & Walsh, C.T. (2002) Yersiniabactin Synthetase. A Four-Protein Assembly Line Producing the Nonribosomal Peptide/Polyketide Hybrid Siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol*, **9**, 333-344.
- Miller, D.A. & Walsh, C.T. (2001) Yersiniabactin synthetase: probing the recognition of carrier protein domains by the catalytic heterocyclization domains, Cy1 and Cy2, in the chain-initiating HWMP2 subunit. *Biochemistry*, **40**, 5313-5321.
- Milne, J.C., Eliot, A.C., Kelleher, N.L. & Walsh, C.T. (1998) ATP/GTP hydrolysis is required for oxazole and thiazole biosynthesis in the peptide antibiotic microcin B17. *Biochemistry*, **37**, 13250-13261.
- Mofid, M.R., Finking, R. & Marahiel, M.A. (2002) Recognition of hybrid PCP/ACP acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem*, **26**, in press.
- Mofid, M.R., Marahiel, M.A., Ficner, R. & Reuter, K. (1999) Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1098-1100.
- Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D.D., Gorlach, J., Mayo, J.M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J. & Ligon, J.M. (2000) The biosynthetic gene

- cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol*, **7**, 97-109.
- Mootz, H.D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A.** (2002a) Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes. *J Am Chem Soc*, **124**, 10980-10981.
- Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1997) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol*, **179**, 6843-6850.
- Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1999) Design and application of multimodular peptide synthetases. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 341-348.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A.** (2000) Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5848-5853.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A.** (2002b) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, **3**, 490-504.
- Neumüller, A.M., Konz, D. & Marahiel, M.A.** (2001) The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem*, **268**, 3180-3189.
- Parris, K.D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl, M., Fritz, C.C., Seehra, J. & Somers, W.S.** (2000) Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. *Structure Fold Des*, **8**, 883-895.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H. & Skurray, R.A.** (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev*, **60**, 575-608.
- Pavela-Vrancic, M., Dieckmann, R., Dohren, H.V. & Kleinkauf, H.** (1999) Editing of non-cognate aminoacyl adenylates by peptide synthetases. *Biochem J*, **342 Pt 3**, 715-719.
- Pazirandeh, M., Chirala, S.S. & Wakil, S.J.** (1991) Site-directed mutagenesis studies on the recombinant thioesterase domain of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **266**, 20946-20952.
- Philipp, W.J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., Bergh, S., Bloom, B.R., Jacobs, W.R., Jr. & Cole, S.T.** (1996) An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3132-3137.
- Pieper, R., Haese, A., Schroder, W. & Zocher, R.** (1995) Arrangement of catalytic sites in the multifunctional enzyme enniatin synthetase. *Eur J Biochem*, **230**, 119-126.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-599.
- Quadri, L.E., Keating, T.A., Patel, H.M. & Walsh, C.T.** (1999) Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry*, **38**, 14941-14954.
- Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H. & Walsh, C.T.** (1998a) Identification of a mycobacterium tuberculosis gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol*, **5**, 631-645.

- Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. & Walsh, C.T.** (1998b) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, **37**, 1585-1595.
- Rapaport, E., Remy, P., Kleinkauf, H., Vater, J. & Zamecnik, P.C.** (1987) Aminoacyl-tRNA synthetases catalyze AMP----ADP----ATP exchange reactions, indicating labile covalent enzyme-amino-acid intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7891-7895.
- Rawlings, M. & Cronan, J.E., Jr.** (1992) The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J Biol Chem*, **267**, 5751-5754.
- Reid, R., Piagentini, M., Rodriguez, E., Ashley, G., Viswanathan, N., Carney, J., Santi, D.V., Hutchinson, C.R. & McDaniel, R.** (2003) A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. *Biochemistry*, **42**, 72-79.
- Reimann, C., Patel, H.M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C.T. & Haas, D.** (2001) Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **183**, 813-820.
- Reimann, C., Serino, L., Beyeler, M. & Haas, D.** (1998) Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **144** (Pt 11), 3135-3148.
- Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A. & Ficner, R.** (1999) Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme *sfp*: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *Embo J*, **18**, 6823-6831.
- Rieber, M., Imaeda, T. & Cesari, I.M.** (1969) Bacitracin action on membranes of mycobacteria. *J Gen Microbiol*, **55**, 155-159.
- Rodriguez, E. & McDaniel, R.** (2001) Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 526-534.
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiainen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. & Sivonen, K.** (2000) Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol*, **37**, 156-167.
- Roy, R.S., Gehring, A.M., Milne, J.C., Belshaw, P.J. & Walsh, C.T.** (1999) Thiazole and oxazole peptides: biosynthesis and molecular machinery. *Nat Prod Rep*, **16**, 249-263.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. & Keller, U.** (2000) Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides. *Chem Biol*, **7**, 287-297.
- Schechter, N., Momose, K. & Rudney, H.** (1972) The effect of bacitracin and Ca ++ on the formation of polyprenylpyrophosphates and their incorporation into ubiquinone precursors in mammalian and bacterial systems. *Biochem Biophys Res Commun*, **48**, 833-839.
- Schneider, A. & Marahiel, M.A.** (1998) Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-

- ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol*, **169**, 404-410.
- Schneider, A., Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A.** (1998) Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Mol Gen Genet*, **257**, 308-318.
- Schneider, T.L., Shen, B. & Walsh, C.T.** (2003) Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry*, **42**, 9722-9730.
- Schreiber, S.L.** (1998) Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg Med Chem*, **6**, 1127-1152.
- Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M.A.** (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*, **20**, 275-287.
- Schwarzer, D. & Marahiel, M.A.** (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, **88**, 93-101.
- Schwarzer, D., Mootz, H.D., Linne, U. & Marahiel, M.A.** (2002) Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14083-14088.
- Schwarzer, D., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (2001) Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. *Chem Biol*, **8**, 997-1010.
- Scutcliffe, J.G.** (1979) Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Meth. Enzymol.*, **43**, 77-90.
- Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C. & Walsh, C.T.** (1999) Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem Biol*, **6**, 385-400.
- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Edwards, D.J., Chen, M. & Murrell, J.M.** (2002) Cloning and characterization of the bleomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *J Nat Prod*, **65**, 422-431.
- Shin-ya, K., Wierzba, K., Matsuo, K., Ohtani, T., Yamada, Y., Furihata, K., Hayakawa, Y. & Seto, H.** (2001) Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J Am Chem Soc*, **123**, 1262-1263.
- Silakowski, B., Kunze, B. & Muller, R.** (2001) Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Gene*, **275**, 233-240.
- Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blocker, H., Hofle, G. & Muller, R.** (2000) The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur J Biochem*, **267**, 6476-6485.
- Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blocker, H., Hofle, G., Beyer, S. & Muller, R.** (1999) New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem*, **274**, 37391-37399.
- Smith, D.J., Earl, A.J. & Turner, G.** (1990) The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *Embo J*, **9**, 2743-2750.
- Stachelhaus, T., Huser, A. & Marahiel, M.A.** (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol*, **3**, 913-921.

- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. & Marahiel, M.A.** (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem*, **273**, 22773-22781.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **6**, 493-505.
- Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M.A.** (1995) Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science*, **269**, 69-72.
- Stachelhaus, T. & Walsh, C.T.** (2000) Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry*, **39**, 5775-5787.
- Staunton, J. & Weissman, K.J.** (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep*, **18**, 380-416.
- Steffensky, M., Muhlenweg, A., Wang, Z.X., Li, S.M. & Heide, L.** (2000) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 1214-1222.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. & Morris, H.R.** (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem*, **271**, 15428-15435.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P. & Vater, J.** (1999) Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem Biol*, **6**, 31-41.
- Stone, K.J. & Strominger, J.L.** (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 3223-3227.
- Storm, D.R. & Strominger, J.L.** (1973) Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptide interactions. *J Biol Chem*, **248**, 3940-3945.
- Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G.** (1990) System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In Levkovits, I. and Pernis, B. (eds.), *Immunological Methods*, pp. 121-152.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Symmank, H., Saenger, W. & Bernhard, F.** (1999) Analysis of engineered multifunctional peptide synthetases. Enzymatic characterization of surfactin synthetase domains in hybrid bimodular systems. *J Biol Chem*, **274**, 21581-21588.
- Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C. & Julien, B.** (2000) Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science*, **287**, 640-642.
- Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T.** (2000) Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature*, **407**, 215-218.
- van Wageningen, A.M., Kirkpatrick, P.N., Williams, D.H., Harris, B.R., Kershaw, J.K., Lennard, N.J., Jones, M., Jones, S.J. & Solenberg, P.J.** (1998)

- Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem Biol*, **5**, 155-162.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D.** (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 615-619.
- von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R.** (1997) Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem Rev*, **97**, 2675-2706.
- Walsh, C.** (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, **406**, 775-781.
- Walsh, C.T.** (2002) Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chembiochem*, **3**, 125-134.
- Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A. & Patel, H.M.** (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 525-534.
- Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. & Leitner, E.** (1994) The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet*, **26**, 120-125.
- Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A. & Holak, T.A.** (2000) Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure Fold Des*, **8**, 407-418.
- Weinig, S., Mahmud, T. & Müller, R.** (2003) Markerless mutations in the myxothiazol biosynthetic gene cluster: A delicate megasynthetase with a superfluous Nonribosomal peptide synthetase domain. *Chem Biol*, **10**, in press.
- Wyckoff, E.E., Stoebner, J.A., Reed, K.E. & Payne, S.M.** (1997) Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol*, **179**, 7055-7062.
- Zamenhof, P.J. & Villarejo, M.** (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.*, **110**, 171-178.
- Zocher, R., Nihira, T., Paul, E., Madry, N., Peeters, H., Kleinkauf, H. & Keller, U.** (1986) Biosynthesis of cyclosporin A: partial purification and properties of a multifunctional enzyme from *Tolypocladium inflatum*. *Biochemistry*, **25**, 550-553.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel danke ich für die Bereitstellung der interessanten Arbeitsthemen, für die engagierte Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Lars O. Essen möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Marahiel und der Nachwuchsgruppen danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Bei den „Mitbewohnern“ aus dem Labor 4716, im Besonderen bei Robert Finking und Martin Hahn, möchte ich mich für die Unterstützung bei den großen und kleinen Problemen des (Labor-)Alltags bedanken. Weitere Aufbauhilfe während der Arbeit und in der Freizeit leisteten Katrin Eppelmann, Torsten Stachelhaus, Dirk Schwarzer, Jürgen May und Stephan Grünewald.

Für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Asp-Phe-Synthetasen bedanke ich mich bei Sascha Dökel.

Für die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung bei den Untersuchungen zur Asp-Phe-Produktion bedanke ich mich bei den Firmen Holland Sweetener Company V.o.F. und DSM (Geelen, Niederlande) sowie DSM-Biotech (Jülich). Insbesondere die Diskussionen mit Dr. Theo Sonke, Dr. Leon Raeven und Dr. Marco Krämer haben den Erfolg dieses Projektes ermöglicht.

Für die schnelle und kritische Durchsicht des Manuskriptes danke ich Katrin Eppelmann, Martin Hahn und Henning Mootz.

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders meiner Freundin Petra Mauntel danken. Ihre liebevolle Geduld und ausdauernde Hilfe waren in den vergangenen Jahren ein wichtiger Rückhalt.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion bedanken. Meinen Eltern widme ich diese Arbeit.